

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS



TESIS DOCTORAL

**Producción biotecnológica de ácido D-Láctico a partir de
residuos de naranja**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Isabel Torre Pascual

Directores

Victoria E. Santos Mazorra
Miguel Ladero Galán

Madrid

© Isabel Torre Pascual, 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y DE
MATERIALES**



**PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE ÁCIDO
D-LÁCTICO A PARTIR DE RESIDUOS DE
NARANJA**

Memoria para optar al grado de Doctor, presentada por:

Isabel de la Torre Pascual

Madrid, 2019



U N I V E R S I D A D
COMPLUTENSE
M A D R I D

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. _____,
estudiante en el Programa de Doctorado _____,
de la Facultad de _____ de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

y dirigida por: _____

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a ____ de _____ de 20____

Fdo.: _____

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

La Dra. Victoria Eugenia Santos Mazorra, Catedrática de Universidad en Ingeniería Química, y el Dr. Miguel Ladero Galán, Profesor Titular de Universidad de Ingeniería Química, afirman haber dirigido el trabajo recogido en la presente Memoria, realizado en el Departamento de Ingeniería Química y de Materiales, de la Facultad de Ciencias Químicas en la Universidad Complutense de Madrid y que, a su juicio, reúne los requisitos de originalidad y rigor científico necesarios para ser presentado como Tesis Doctoral.

Los directores,

Dra. Victoria E. Santos Mazorra

Dr. Miguel Ladero Galán

AGRADECIMIENTOS

En unas semanas voy a poner fin a una de las etapas más duras y, a la vez, de las más bonitas de mi vida. Una etapa llena de altibajos, obstáculos, trabajo duro y, en ocasiones, desesperación y caos absoluto; pero también ha sido una etapa de aprendizaje, tanto a nivel profesional como personal, una etapa de superación y llena de momentos inolvidables. En definitiva, una etapa única, que tras algo más de cuatro años, llega a su fin, y no quisiera pasar por alto la oportunidad de agradecer a todas las personas que han hecho posible que esta Tesis salga adelante.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores, Victoria E. Santos y Miguel Ladero, la oportunidad que me dieron para poder dedicarme a lo que me gusta. Gracias por confiar en mí y permitirme formarme y trabajar en la investigación. También me gustaría agradecerles la labor de dirección durante estos años, por el tiempo dedicado y la paciencia que han tenido conmigo. Por otro lado, quiero dar las gracias a Miguel Ladero por demostrarme que la inquietud por aprender y la curiosidad por la ciencia nunca se pierden. De la misma manera quiero agradecer a Victoria E. Santos que supiese poner orden dentro del caos, dar luz en los momentos más oscuros, y enseñarme diferentes puntos de vista ante los problemas. No me puedo olvidar del resto de componentes del grupo Físico-Química de los Procesos Industriales y Medio-Ambientales (FQPIMA), donde incluyo a Félix García-Ochoa, María Isabel Guijarro, Pedro Yustos, José Manuel Toledo y Emilio Gómez. A todos ellos les tengo que agradecer los momentos compartidos en reuniones, seminarios, fiestas en la planta piloto, horas de prácticas y ratitos de descanso, sin esos momentos, estos años no habrían sido iguales.

Me gustaría continuar estos agradecimientos con las personas que más apoyo moral me han dado durante estos años, mis compañeros de laboratorio. Ellos han sido un pilar fundamental para el desarrollo de este trabajo, y me han demostrado que, aunque parezca que no, la Tesis se acaba. En primer lugar, quiero agradecer a, el ya doctor, Alberto Rodríguez el tiempo dedicado para enseñarme desde poner un reactor hasta hacer modelos cinéticos o cómo hacer un *fed-batch*; gracias por el apoyo, los consejos del día a día y el ánimo en los momentos más difíciles. Siempre será el “borde del labo”, pero a la vez, es de las mejores personas que he conocido en estos años, siempre dispuesto a ayudar y echar una mano en todo lo que haga falta, dentro y fuera del laboratorio. En este sentido, me gustaría agradecer a Susana de la Morena la comprensión, el apoyo, los

consejos y su gran capacidad y paciencia para enseñar. No me puedo olvidar, del señor Mateusz Wojtusik, con quien he compartido todos estos años de Tesis, siempre dispuesto a darte su peculiar opinión ante cualquier duda. Gracias por los momentos compartidos de risas, y a veces de lamentos, gracias por ser único. En estos años también tuve el placer de coincidir con “el gran” Alberto Ramón (grande como persona y grande como profesional), al que quiero agradecerle su optimismo y alegría que hacía más llevaderas las largas horas de experimentos. Y por supuesto, no me puedo olvidar de agradecerle el tiempo que dedicó para transformar mis ideas en números. Aunque no llegué a coincidir con ella en el laboratorio, tuve la suerte de conocer a Vanessa Ripoll a quien le agradezco sus consejos desde la experiencia. Fuera de FQPIMA, tuve la suerte de conocer a Pablo Brea y Cristina Prieto con quien he compartido cafés, comidas, cañas y algún que otro *gin tonic*. En primer lugar, me gustaría agradecer a Pablo Brea su paciencia para explicarme, hasta el momento sin éxito, qué son los PSA, pero también quiero darle las gracias por estar ahí, por estar siempre dispuesto a escuchar, y por distraerme de la rutina del laboratorio cada día. A Cristina Prieto quiero agradecerle sus consejos y ayuda en estos años. Con todos ellos he tenido la suerte y el placer de compartir, en mayor o menor medida, estos años de Tesis. Gracias a todos ellos por ayudarme a sacar una Tesis adelante sin morir en el intento, sin vosotros esto no hubiera sido posible. También quiero agradecer a los nuevos compañeros de laboratorio, Víctor Martín e Itziar Arias, su paciencia conmigo en el último año de Tesis. A ellos les deseo lo mejor, que disfruten y aprovechen para aprender todo lo que puedan durante sus años de Tesis.

A continuación, quiero dedicar unas líneas a una de las personas más importantes de mi vida, Miguel García. Una persona que siempre ha creído en mí, que me ha apoyado siempre que lo he necesitado, que ha sabido darme la fuerza y el ánimo en los momentos más duros y con quien tengo la suerte de poder compartir mi profesión, mis dudas, mis inquietudes y mi vida. A él quiero agradecerle todo. Gracias por compartir conmigo estos 10 últimos años; gracias por entender mis agobios y ayudarme a salir de ellos; gracias por aguantarme, que a veces sé que no es fácil; y gracias por entender que la investigación es parte de mi vida.

No me puedo olvidar de dar las gracias a las dos personas que siempre han estado a mi lado, a mi madre y a mi hermana. A ellas les debo todo lo que soy y todo lo que he conseguido. Y por supuesto, gracias a mi familia (incluyendo Pascual, García y Acedos), gracias por poder contar con vosotros siempre, por la fuerza que me transmitís, por el

apoyo incondicional y el esfuerzo que hacéis en intentar entender lo que hago. Por todo ello mil gracias.

Igualmente, y porque forman parte de mi familia también, quiero dar las gracias a Iris Azami y Paloma García por todo lo que hemos compartido; a Tamara Aceña, por aguantarme desde niña y darle locura a mi vida. A todos los amigos que han estado ahí durante este tiempo, escuchándome y dando ánimos.

Además, quiero agradecer a Teresa Cesário y a la profesora Manuela da Fonseca por darme la oportunidad de trabajar con ellas durante tres meses y acogerme en su grupo. Durante esos meses tuve la oportunidad de conocer a gente estupenda: Maryna, Beatrix, Stepan, Sebastiano, y la doctora Carla Carvalho.

No me puedo olvidar de todas las personas que he tenido oportunidad de conocer en estos años y compartir con ellas tiempo y experiencias: Paqui, Marianela, Andrea, Álvaro, Andrés, Elena, Hassana, Florina, Vicky, Marimar, Cris, Sandra, Antonio, Clara, Alberto y Priscila.

Por último, me gustaría agradecer al Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades por financiar los proyectos en los cuales se enmarca esta Tesis (CTQ-2013-45970-C2-1-R y PCIN-2013-021-C02-01), y que me han permitido poder realizar este trabajo.

ÍNDICE

Resumen	1
Summary.....	5
Introducción.....	11
1. De la Biotecnología a las Biorrefinerías	12
2. Revalorización de Biomasa lignocelulósica	15
2.1. Pretratamientos.....	19
2.2. Hidrólisis enzimática.....	20
2.2.1. Enzimas responsables de la hidrólisis.....	20
2.2.2. Factores que afectan a la hidrólisis enzimática.....	22
3. Producción de Ácido Láctico.....	24
3.1. Ácido láctico: Síntesis Química vs Biotecnológica.....	24
3.2. Aplicaciones del ácido láctico.....	26
3.3. Mercado actual del ácido láctico	28
3.4. Polímeros del ácido láctico (PLAs).....	29
4. Producción Biotecnológica de ácido láctico	32
4.1. Microorganismos productores de ácido láctico.....	32
4.2. Factores que afectan a la producción biotecnológica.....	35
4.3. Formas de operación	37
5. Retos en la revalorización de biomasa para producción de ácido D-Láctico	39
6. Bibliografía	42
Objeto y alcance del trabajo	59
Materiales y métodos.....	65
1. Materiales.....	65
1.1. Materia prima y enzimas	65
1.2. Microorganismo	66

1.3. Medios de cultivo	68
2. Equipos empleados	69
2.1. Sistemas de reacción	69
2.2. Equipos de análisis	70
2.3. Equipos auxiliares	71
3. Procedimientos experimentales	71
3.1. Pretratamiento del residuo.....	72
3.2. Hidrólisis enzimática del residuo	72
3.3. Etapa de fermentación.....	73
3.3.1. Conservación del microorganismo	74
3.3.2. Preparación de las células para producción de ácido D-láctico	74
3.3.3. Producción de ácido D-láctico	75
4. Métodos de análisis.....	77
4.1. Determinación de actividades enzimáticas	77
4.2. Determinación de la concentración de biomasa.....	78
4.3. Determinación de la composición de las muestras de reacción	79
5. Métodos de cálculo	80
6. Bibliografía	82
Resultados y Discusión.....	87
1. Estudio de la hidrólisis enzimática de residuos de naranja.....	89
1.1. Estudio de la hidrólisis enzimática en operación <i>batch</i>	90
1.2. Estudio de la hidrólisis enzimática en operación <i>fed-batch</i>	100
2. Estudios de la etapa de Fermentación para la producción de ácido D-láctico.....	104
2.1. Empleo de células en estado de crecimiento	105
2.1.1. Influencia de las variables de operación	105
2.1.2. Estudio del medio de producción.....	107
2.2. Empleo de células en estado de <i>resting cells</i>	115

3. Modelización de las etapas del proceso	122
3.1. Etapa de hidrólisis	122
3.2. Etapa de Fermentación	124
4. Abreviaturas y Nomenclatura	133
4.1. Abreviaturas	133
4.2. Nomenclatura	133
Conclusiones.....	139
1. Optimización de la Hidrólisis enzimática.....	139
2. Optimización de la Fermentación	140
2.1. Empleo de células en estado de crecimiento	141
2.2. Empleo de células en estado de <i>resting</i>	142
2.3. Modelización cinética	143
Conclusions	145
1. Enzymatic hydrolysis stage.....	145
2. Fermentation stage.....	146
2.1. Fermentation using growing cells	147
2.2. Fermentation using resting cells.....	147
2.3. Kinetic Modelling	148
Anexo: Publicaciones	153

RESUMEN

Producción biotecnológica de ácido D-láctico a partir de residuos de naranja

El ácido láctico es un compuesto que se produce por la vía biotecnológica desde los años 90 empleando como sustrato almidón o caña de azúcar. La aplicación más común de este ácido, en su enantiómero L-, es como aditivo en el sector alimentario. En la actualidad, las aplicaciones del ácido láctico son diversas, siendo destacable la síntesis de polímeros de ácido láctico, o PLA (*polylactic acid*), un polímero biodegradable. Para la síntesis de estos biopolímeros, se requieren isómeros puros de ácido láctico, ya que las propiedades del polímero dependen de la proporción de ambos isómeros; por lo tanto, se ha hecho imprescindible el desarrollo de nuevos métodos para la producción de ambos isómeros de ácido láctico, capaces de competir con la industria del petróleo en estas nuevas aplicaciones. Existen numerosos trabajos relativos a la producción del isómero L-, por lo que el objetivo de este trabajo es la obtención del isómero de ácido D-láctico (D-LA).

Para ello, se pretende desarrollar un proceso biotecnológico, dentro del concepto de biorrefinería, por lo que se propone el uso de biomasa lignocelulósica como materia prima. Este tipo de materiales necesitan diversas etapas: pretratamiento, hidrólisis enzimática y, finalmente, fermentación de los azúcares obtenidos de la etapa previa, para obtener, como producto principal de la misma en este caso, el isómero D- del ácido láctico. En este trabajo se utilizan los residuos de la industria de zumos de naranja como materia prima, empleando la bacteria homofermentativa (es decir, que no genera subproductos) *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* y se estudian las tres etapas comentadas del proceso.

En primer lugar, se caracterizan los residuos de naranja para conocer la composición de partida; los residuos de naranja presentan un 80 % de humedad y el sólido seco está constituido por 35 % de glucosa y fructosa libre, 20 % de celulosa, 15 % de hemicelulosa y 6,5 % de lignina.

En segundo lugar, como pretratamiento, se realiza una molienda hasta un tamaño de partícula de 2 mm para mejorar la accesibilidad de las enzimas empleadas en la sacarificación, utilizándose diversas preparaciones comerciales (Novozyme 188, Celluclast 1.5L y Pectinex Ultra SP). Después, se optimizan los valores de las variables

que afectan al rendimiento del proceso, obteniendo los mejores resultados a un pH de 5,2 ajustado al inicio y transcurridos 5 minutos de reacción, 50 °C y 300 rpm. También se analiza la influencia del porcentaje de sólido en esta etapa en combinación con las concentraciones de las diversas enzimas empleadas, así como la influencia del secado del sólido, previo a la etapa de hidrólisis enzimática.

Para conseguir una concentración elevada de monosacáridos en el hidrolizado, además de operar en discontinuo, también se lleva a cabo el proceso en *fed-batch* (introduciendo únicamente residuo molido con el porcentaje de humedad previamente fijado), sirviendo este último modo de operar para reutilizar las enzimas y minimizar este importante coste del proceso. Llevando a cabo el proceso en discontinuo, empleando un 10,1 % de sólido seco y 12 µL/g de Celluclast 1.5L, 13,7 µL/g de Novozyme 188 y 10,2 µL/g de Pectinex Ultra SP, se obtienen 60 g/L de azúcares totales. En el caso de operar en *fed-batch*, se consigue obtener 120 g/L de azúcares totales y 110 g/L de azúcares fermentables (glucosa, fructosa y galactosa), empleando residuo de naranja seco al 60 % y una cantidad de enzimas muy reducida (0,6 µL/g de Celluclast 1.5L, 0,7 µL/g de Novozyme 188 y 0,4 µL/g de Pectinex Ultra SP, expresadas por gramo de sólido final).

Con las diferentes mezclas de monosacáridos obtenidas se estudia la etapa de fermentación para la producción de D-LA. En primer lugar, utilizando el medio empleado en la literatura (MRS) pero con las concentraciones de monosacáridos correspondientes a un hidrolizado enzimático de residuo de naranja (un medio modelo sintético), se optimizan las variables de operación del proceso de producción de D-LA (temperatura y pH).

Para reducir los costes debidos al empleo del medio MRS en la producción, se estudia la posible eliminación/sustitución de la fuente de nitrógeno a emplear en el proceso. Como resultado, se consigue sustituir todos los componentes del citado medio por *corn steep liquor* (CSL), lo que reduce drásticamente el precio del medio de producción. Dentro del estudio de la composición del medio de cultivo, se emplea el hidrolizado del residuo de naranja, obtenido en discontinuo y en las condiciones optimizadas del proceso enzimático. Los resultados con el hidrolizado son muy similares a los obtenidos con el medio modelo. También se lleva a cabo la fermentación del hidrolizado del residuo obtenido en *fed-batch*, observando, de nuevo,

que el uso de un medio modelo sintético con la misma composición en monosacáridos proporciona resultados muy similares. En este caso, la elevada concentración de monosacáridos del hidrolizado, muestra un efecto inhibitorio, por lo que se lleva a cabo la fermentación a partir del hidrolizado diluido.

Finalmente, se estudia la posibilidad de emplear el microorganismo en estado de *resting cells*; inicialmente, y como prueba de concepto, con un medio modelo sintético con la composición en azúcares correspondiente al hidrolizado, demostrando la viabilidad del empleo de las células en este estado para el proceso. Se determina, asimismo, la influencia de la agitación y la concentración de biomasa en la fermentación; así como la adaptación de las células para favorecer el consumo de fructosa y galactosa, mediante su empleo en las etapas de producción del inóculo que se emplea en la fermentación.

En las condiciones determinadas, se lleva a cabo la producción de ácido D-láctico a partir del hidrolizado del residuo de naranja, de igual forma a lo estudiado con células en estado de crecimiento, observando que la presencia del residuo (que contiene proteínas) permite el crecimiento del microorganismo, lo que mejora la productividad del proceso. Dependiendo de las concentraciones en monosacáridos presentes en el residuo hidrolizado (obtenido en diferentes formas de operación) es posible conseguir productividades muy superiores - de 6,72 g/(L·h)- a los valores máximos encontrados en la literatura sobre este tema. El fenómeno de inhibición debido a la elevada concentración de azúcares, es más patente en el caso de emplear células en este estado.

La última parte del trabajo consiste en la modelización de las dos etapas (hidrólisis y fermentación) del proceso. En primer lugar, se plantean modelos sencillos de primer orden de tipo fractal para ajustar datos de producción de glucosa por extracción ayudada por enzimas e hidrólisis enzimática de la celulosa y de producción de ácido galacturónico por hidrólisis enzimática de la pectina, dado que la celulosa y la pectina son los dos principales polímeros de los residuos de naranja. En ambos casos, se considera la desactivación que sufren las enzimas durante el proceso a través de ecuaciones de orden 1 relativas a la actividad residual. En segundo lugar, se plantea y aplica un modelo cinético no estructurado-no segregado para la etapa de fermentación y se ajusta a diversos experimentos (diferentes valores de pH,

temperatura, composición del medio de cultivo -incluyendo el empleo del residuo de naranja hidrolizado con diferente composición en monosacáridos- y estado de las células -crecimiento y *resting cells*-) siendo destacable que es capaz de reproducir adecuadamente todos ellos.

SUMMARY

D-lactic acid biotechnology production from orange peel waste)

Lactic acid (LA) is a chemical product obtained by a biotechnological process since the 1990s, using starch or sugarcane as raw material. The main application of this acid is as a food additive, so the non-toxic L- enantiomer is the product of interest. Currently, new applications for lactic acid as a platform chemical have been described, mainly in the chemical industry. A major new application is the synthesis of polylactic acids (PLAs), a biodegradable polymer, but it needs of pure isomers. Therefore, new processes to produce pure isomers of LA has been and are developed. To this purpose, a cheaper non-edible substrate, as the lignocellulosic biomass is critical. This substrate requires a moderate to harsh pretreatment followed by saccharification (hydrolysis to monosaccharides) before its use for fermentation. Costs have to be reduced for both saccharification (enzymes) and fermentation (broth components). Moreover, LA producers, different strains of *Lactobacillus* genus, have high nutritional requirements. Finally, LA purification remains to be a costly process. This work has the aim of studying the biotechnology production of LA with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* from orange waste.

Orange peel waste here employed has 80 % humidity and contains 35 % free sugars (mainly, glucose and fructose), 20 % cellulose, 15 % hemicellulose and 6.5 % lignin. This material was milled to a size of 2 mm. The milled residue is subjected afterwards to enzymatic saccharification with a mixture of Novozyme 188, Celluclast 1.5L and Pectinex Ultra SP. In this part of the experimental work, the variables that affect the final yields of the process were optimized, obtaining the best results at pH of 5.2 adjusted before the reaction and after the first 5 minutes, 50 °C and 300 rpm.

Attending to the concentration of enzymes, 5 cocktails of enzymes were studied, at different concentrations. The results of these experiments show that working with a high concentration of enzyme improves the yields. However, high concentrations of enzymes are not economically viable. Therefore, a compromise between the final concentration of sugars and the enzymes used was determined. Solid content is also a critical variable: at 10.1 % w/w of solid and a reduced enzyme concentration (12 µL/g of Celluclast 1.5L, 13.7 µL/g of Novozyme 188 and 10.2 µL/g of Pectinex Ultra SP)

the final concentration of sugars is 60 g/L, including glucose, fructose, galactose and arabinose.

Furthermore, partial drying was proposed as pretreatment for this kind of wastes, with the aim of increasing the concentration of sugars in the hydrolysate. For this, different experiments were carried out operating in batch and fed-batch at different concentrations of enzymes. This pretreatment was a good option to work in fed-batch (5 feedings) since the concentration of sugars increases. The use of orange waste dried at 60 % reduced the enzyme concentration (0.6 $\mu\text{L/g}$ of Celluclast 1.5L, 0.7 $\mu\text{L/g}$ of Novozyme 188 and 0.4 $\mu\text{L/g}$ of Pectinex Ultra SP, added amount of each cocktail by gram of final dry solid), while the sugar concentration reaches 120 g/L, with 110 g/L of fermentable monosaccharides (glucose, fructose and galactose).

Then, the fermentation stage was studied to optimize the production of D-LA. For this part of the research, different experiments were carried out in closed bottles incubated in an orbital shaker with temperature control and with stirred tank bioreactor (STBR). At first, the pH and temperature were optimized to 40 °C and pH value of 5.8. Moreover, the type and amount of the complex nitrogen source in the culture broth was studied to reduce costs, including peptone, meat extract (ME), yeast extract (YE) and corn steep liquor (CSL). The results reveal the importance of using a high concentration of nitrogen, in addition to the importance that this nitrogen, present in the broth, is easy to assimilate. Therefore, ME and YE achieve the best results, but also the highest cost, so CSL at 37 g/L was chosen, because of its low price.

Once the most important variables were optimized in the fermentation stage with growing cells, the effect of the hydrolysate of orange peel waste was tested. The strain has a lag phase and a period of adaptation to the hydrolysate longer than when the simulated broth is used. This longer lag phase reduces the productivity of the process. Finally, the production of D-lactic acid with growing cells from batch hydrolysate supplemented with 37 g/L of CSL and in the best conditions reached 41.11 g/L of LA and a productivity of 2.35 g/L. In the case of using the hydrolysate obtained in fed-batch also supplemented with 37 g/L of CSL, 83.20 g/L of lactic acid are obtained and a productivity of 1.57 g/(L·h).

Afterwards, the possibility of carrying out the process with resting cells was tested. Working with resting cells involves two steps: the first where the biomass is

grown and the second where the cells, without growth, are used to produce D-LA. The resting cells reduce operating costs by reducing the nitrogen source concentration (or avoiding it altogether) and simplifying the purification of broth.

First, several experiments show the effect of agitation and biomass concentration during the production of the D-LA stage. Cells are grown in a broth with glucose. The results of these experiments show that the uptake of fructose and galactose is very slow, with worst productivity and yields. Because of this, the effect of the carbon source used during the growth stage is studied. Then, a set of experiments is carried out to observe the effect in the production stage of cells grown from glucose or fructose. The results show that the cells grown in fructose are able to uptake the fructose faster than the cells grown in glucose during the production stage of D-LA (60 % faster). Therefore, to work with cells grown in fructose, 800 rpm and 10 g/L of biomass in the resting stage is the best choice.

When using the hydrolysate as feedstock, the presence of nitrogen in the orange waste allows the growth of the biomass in the resting stage and this growth improves the results and 48 g/L of D-LA and 6.72 g/(L·h) of productivity are reached with the hydrolysate obtained in batch. In the case of using the hydrolyzed broth obtained in a fed-batch in the same conditions described above, an inhibition of the process was observed by a high concentration of sugars and other inhibitors, such as phenolics or essential oil components. Therefore, the hydrolysate was diluted to 80 % to overcome the inhibitory effects, obtaining, 81 g/L of LA and a productivity of 3.7 g/(L·h).

The last part of this work is the modelization of both saccharification and fermentation steps. For the first one, simple first order fractal models with total first order deactivation for the relevant enzymatic activity are proposed and fitted to glucose and galacturonic acid data. It should be noted that cellulose and pectin are the main polymers for orange peel waste. For the fermentation, a non-structured non-segregated kinetic model, with variations, is applied to data of a wide range of experiments (pH, temperature and cellular condition –in growing state, in resting state-), being the model able to be fitted to all experimental data.



INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El petróleo es un recurso natural no renovable que se descubrió en 1859, pero no fue hasta principios del siglo XX cuando revolucionó la industria, principalmente en el sector del automóvil. Más adelante, el desarrollo de la tecnología del petróleo y de la química industrial permitió cubrir las necesidades energéticas, químicas y de materiales, dando lugar a lo que se conoce como Segunda Revolución Industrial. Esto ha permitido un incremento de la población mundial, una mejora en el nivel de vida y un desarrollo económico y tecnológico nunca visto. En la actualidad, el 80 % de la energía que se consume y el 90 % de los compuestos químicos empleados provienen del petróleo. Por tanto, la industria del petróleo ha aportado grandes beneficios y ha auspiciado un desarrollo socioeconómico hasta llegar a la sociedad moderna que conocemos actualmente [1-4]. Sin embargo, la explotación de este recurso también ha tenido importantes consecuencias negativas. Por un lado, la quema de combustibles fósiles es una de las principales fuentes de emisión de gases a la atmósfera responsables del efecto invernadero, como CO₂, CH₄ o NO_x, generando un aumento de la temperatura en la Tierra, lo que provoca el denominado cambio climático [5, 6]. Por otro lado, la síntesis de compuestos químicos derivados del petróleo genera grandes cantidades de residuos cada año, que contaminan el medioambiente. Además, a causa del rápido crecimiento de la población mundial, que cada vez demanda más energía y materiales derivados del petróleo, la acumulación de residuos será cada vez mayor. La contaminación generada por la tecnología del petróleo perjudica seriamente el medioambiente, no solo poniendo en riesgo los ecosistemas del planeta, sino también reduciendo la disponibilidad de recursos naturales como el agua o el alimento [2, 7].

Por consiguiente, la dependencia por los recursos fósiles no es sostenible en el tiempo por los inconvenientes que presenta, además de que es un recurso no renovable. Se han propuesto muchas posibles fuentes de energía renovables como alternativa a la energía obtenida del petróleo, como la energía eólica o energía solar; pero únicamente la biomasa como materia prima y el desarrollo de las biorrefinerías tienen el potencial y cumplen con el requisito de producir no sólo energía, sino también compuestos químicos y materiales [5].

1. De la Biotecnología a las Biorrefinerías

La fermentación microbiana es una de las formas más antiguas de biotecnología que se conoce, ya que desde el año 6000 a.C. se consumían alimentos fermentados y bebidas alcohólicas. Sin embargo, no fue hasta 1857 cuando Pasteur demostró que la fermentación era causada por microorganismos, permitiendo el inicio de la industria de procesos fermentativos, que se puede datar a principios del s. XX. Esta industria era capaz de producir etanol, butanol o acetona, además de ácido cítrico o penicilina (como primer antibiótico producido por vía fermentativa). Sin embargo, con el descubrimiento del petróleo, el rápido desarrollo de la industria petrolera y el bajo coste de esta materia prima supusieron que la producción biotecnológica fuese relegada a un segundo plano y sustituida por la síntesis química [8-11].

Tras la primera crisis del petróleo en los años 70, los productos y combustibles de base biológica volvieron a generar gran interés, principalmente entre los países no pertenecientes a la Organización de Países Exportadores de Petróleo (OPEP) [10]. Durante estos años hubo grandes avances principalmente en biología molecular e ingeniería genética, como el descubrimiento de la estructura del ADN y el código genético, que permitieron desarrollar toda la tecnología del ADN recombinante (ver **Tabla 1**). Estos conocimientos, junto con el desarrollo científico en las áreas de microbiología y bioquímica, aplicados a la tecnología en ingeniería química o ingeniería de procesos, dieron lugar a lo que hoy se conoce como Biotecnología Industrial [7, 12]. Este término aparece por primera vez en la literatura en los años 80, cuando se planteó usar la ingeniería genética no solo en las aplicaciones médicas [9]. Se puede definir como “el desarrollo de cualquier proceso de bioconversión, ya sea mediante fermentación microbiana, cultivo celular o biocatálisis, para producir energía, compuestos químicos o materiales” [7]. Desde los inicios de la Biotecnología Industrial, a principios de la década de 1970, y la integración de diferentes áreas de conocimiento, han permitido el desarrollo de un conjunto de técnicas, que incluye ingeniería genética, anticuerpos monoclonales, ingeniería de proteínas, bioinformática, cultivo de tejidos, sensores biológicos, fusión de protoplastos, enzimas inmovilizadas, catálisis celular, reactores biocatalíticos e ingeniería de procesos [13]. El desarrollo de la biotecnología, impulsado por los nuevos avances en ciencia y tecnología, junto con la necesidad de buscar materias primas renovables y procesos limpios han contribuido también al desarrollo de la denominada química verde. La

química verde tiene como objetivo desarrollar procesos limpios, que no generen residuos, a partir de fuentes renovables, que permita obtener productos como biopolímeros, solventes, aditivos alimentarios, biocombustibles o compuestos químicos de interés [12, 14]. En conclusión, tanto los avances en biotecnología como en química verde tienen un gran potencial y están cambiando la forma de producir bienes y servicios, y contribuyendo al desarrollo de lo que hoy se conoce como biorrefinerías [10, 13].

Tabla 1. Resumen de los hitos principales en biotecnología desde 1837 hasta 1995.

AÑO	AUTOR	APORTACIÓN
1837-1838	Schwann;Cagniard-Latour	Vinculan las levaduras a la fermentación
1857	Pasteur	Descubre que la fermentación es causada por microorganismos
1894	Fischer	Especificidad de las enzimas: modelo llave-cerradura
1928	Fleming	Efecto de la penicilina
1940	----	Se conoce la estructura de la proteínas
1953	Watson y Crick; Franklin	Explican la estructura del ADN
1955	Severo-Ochoa; Konberg	Replicación del ADN
1957	Zamecnikn y Hoagland	Traducción del ADN
1961-1966	Nirenberg, Khorana...	Describen el código genético
1973	Cohen y Boyer	Desarrollo de plásmidos recombinantes que hacen posible el desarrollo de la Ingeniería genética
1975	Maxam y Gilbert; Sange	Desarrolla métodos para secuenciar el ADN
1978	Hefron	Desarrolla la mutagénesis dirigida
1993	Mojica	Descubrimiento de CRISPR-Cas
1995	Bailey	Estudios en ingeniería metabólica

Como se ha apuntado previamente, las biorrefinerías surgen a raíz de la necesidad de reducir la dependencia actual del petróleo, por lo que su principal objetivo es cubrir la demanda de energía, combustibles y compuestos químicos que hasta ahora se obtienen de este residuo fósil. Este nuevo tipo de industria permitiría desarrollar una economía sostenible, respetuosa con el medio ambiente, mitigando el

impacto del cambio climático y los problemas ocasionados por la industria del petróleo. Existen múltiples acepciones en la literatura que intentan englobar todos los aspectos que implica el término de biorrefinería, por lo que es complicado elegir una. Sin embargo, todas coinciden en algunos conceptos clave que son interesantes destacar para entender qué son las biorrefinerías. Las biorrefinerías integrarían diferentes procesos, con la finalidad de dar lugar a múltiples productos en los que se incluyen combustibles, energía, productos químicos de alto valor añadido y materiales. Con estos términos, se podría estar hablando de una refinería de petróleo, sin embargo, en el prefijo “bio-” es donde reside la diferencia. Este prefijo indicaría que las biorrefinerías se basan en el aprovechamiento de materia procedente de los seres vivos, la biomasa. Por la naturaleza de la materia prima y debidamente desarrolladas, las biorrefinerías deberían ser sostenibles, lo que, por definición, implica que se puedan mantener en el tiempo con un impacto medioambiental mínimo y sin reducir los recursos disponibles, siendo estos renovables [15-17]. Por lo tanto, la finalidad última de las biorrefinerías es proporcionar los bienes y servicios que hasta ahora se obtienen de los recursos fósiles, a partir de una materia orgánica renovable, de forma que resulte sostenible desde la perspectiva social, medioambiental y económica [5, 11, 15, 18]. Igual que en las refinerías del petróleo, el uso de la biomasa en las biorrefinerías permitiría obtener energía y biocombustibles como etanol o isobutanol, además de compuestos químicos como producto final, o que sirvan como base de síntesis para otros compuestos o materiales, a través de múltiples procesos plenamente integrados entre sí.

En los inicios del desarrollo del concepto de biorrefinería, la materia prima empleada eran azúcares del trigo, maíz o remolacha para producir principalmente bioetanol u otros biocombustibles; el uso con ese fin de esta materia prima, que siempre se ha empleado como alimento, no es sostenible en el tiempo porque el alimento disponible en el planeta podría no ser capaz de cubrir las necesidades de la población mundial en el futuro [15, 18, 19]. Las biorrefinerías basadas en el empleo de estas materias primas se denominan **biorrefinerías de primera generación**. A causa de esto, la investigación se ha centrado en buscar nuevas alternativas como materia prima de las biorrefinerías, con el requisito principal de que no sirvan para alimentación y que no tengan ningún otro tipo de utilidad en la sociedad.

Debido a estos problemas, se han propuesto como materia prima para las biorrefinerías los residuos generados a partir de diversas industrias o los materiales lignocelulósicos, de tal manera que la materia prima no compita con el sector alimentario, llegando a lo que se conoce como **biorrefinerías de segunda generación**. Además, también se ha propuesto el empleo de los recursos del mar dando lugar a las **biorrefinerías de tercera generación**, en las que se emplean algas u otros residuos del mar como materia prima, pero este tipo de biorrefinerías, también se centran en la búsqueda de nuevos biocatalizadores de origen marino para llevar a cabo la fermentación [18].

Para el desarrollo del concepto de biorrefinería, es necesario disponer de la tecnología necesaria para la transformación de las diversas materias primas comentadas en los compuestos de interés energético y/o químico. Para ello, se hace imprescindible la aplicación de diversas técnicas de procesamiento de la biomasa, desde su fraccionamiento (mediante procesos físicos, químicos, termoquímicos, etc.) en fracciones más fácilmente aprovechables, hasta los procesos de transformación de esas fracciones en los compuestos químicos, mediante el empleo de catalizadores convencionales, enzimas y células.

2. Revalorización de Biomasa lignocelulósica

Como se ha comentado previamente, la investigación en el campo de las biorrefinerías se enfocó en la búsqueda de nuevas alternativas como materia prima, con el requisito principal de que no sirvan para alimentación y que no tengan ningún otro tipo de utilidad en la sociedad, dando lugar a las biorrefinerías de segunda y tercera generación [18]. Existen múltiples clasificaciones de los distintos tipos de materia prima; atendiendo a su composición se pueden clasificar en: cultivos de almidón y azúcar que corresponden a la materia empleada en las biorrefinerías de primera generación; materiales lignocelulósicos constituidos por lignina y carbohidratos; triglicéridos, donde se incluyen los aceites vegetales y las grasas ya sean saturadas o insaturadas; y, por último, los residuos orgánicos mixtos, que consisten en residuos de origen industrial o municipal con un alto contenido en materia orgánica [10, 15].

La biomasa lignocelulósica es la que, en la actualidad, presenta mayor interés en el campo de las biorrefinerías ya que ofrece una amplia variedad de sustratos con una

composición muy variada. Se suele clasificar dependiendo de su origen en: biomasa lignocelulósica de origen forestal, biomasa con origen en el sector de la agricultura, biomasa que provenga del sector de la industria o bien biomasa de origen marino [15]. Esta biomasa es la parte no comestible de las plantas y no puede ser empleada para alimentación. Además, es una de las fuentes más abundantes de carbono renovable, ya que se genera a partir de luz, agua y la fijación de dióxido de carbono mediante la fotosíntesis. Por tanto, se trata de una fuente renovable, sostenible y respetuosa con el medio ambiente que, además, reduce las emisiones de CO₂ y la contaminación atmosférica. Por otro lado, anualmente se generan grandes cantidades de este tipo de residuos, que pueden ocasionar serios problemas medioambientales, y su eliminación conlleva grandes costes. Por todo esto, la biomasa lignocelulósica es considerada una de las mejores alternativas para sustituir al petróleo [19-21]. Además, numerosos estudios en la literatura han dejado patente el enorme potencial de la biomasa lignocelulósica para producir biocombustibles, biopolímeros y compuestos químicos biodegradables y sostenibles [20,21,25-27]

En la **Figura 1** se muestra la composición de la pared de las células vegetales y la estructura de una fibra de celulosa. Como se puede ver, la biomasa lignocelulósica está constituida por celulosa, hemicelulosa, lignina y, en algunas ocasiones, por pectina, además de proteínas y cenizas, variando la proporción en función del tipo de residuo. El componente mayoritario es la **celulosa**, un polímero estructural presente en la pared de las células vegetales que da soporte y estructura a las plantas. Está constituido por unidades de glucosa unidas mediante enlace β (1-4), dando lugar a cadenas largas, que unidas por puentes de hidrógeno, dan lugar a las fibras de celulosa. La **hemicelulosa** es un heteropolímero de cadena corta con ramificaciones y está constituido por azúcares como glucosa, galactosa, xilosa, arabinosa, y azúcares ácidos como el ácido galacturónico o glucurónico en diferentes proporciones. Su estructura es muy variable según el tipo de residuo y su principal función es proporcionar resistencia estructural uniendo las fibras de celulosa. En el caso de la **lignina**, es un polímero tridimensional de alto peso molecular y naturaleza aromática que confiere rigidez a la pared celular. Actúa como pegamento, además de impermeabilizar la pared vegetal y proteger a la planta contra patógenos [20,21,25-27]. Por último, la **pectina** también forma parte de las paredes celulares. Es uno de los polímeros más complejos que se conocen y está constituido principalmente por ácido galacturónico, además de

ramnosa, arabinosa y galactosa. Todos estos polímeros se unen mediante enlaces covalentes y no covalentes formando un entramado complejo y fuertemente unido, con una digestibilidad relativamente baja. En comparación con la materia prima que se emplea actualmente en la industria, preferentemente almidón, la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica a monosacáridos fermentables es más lenta y compleja [20, 28].

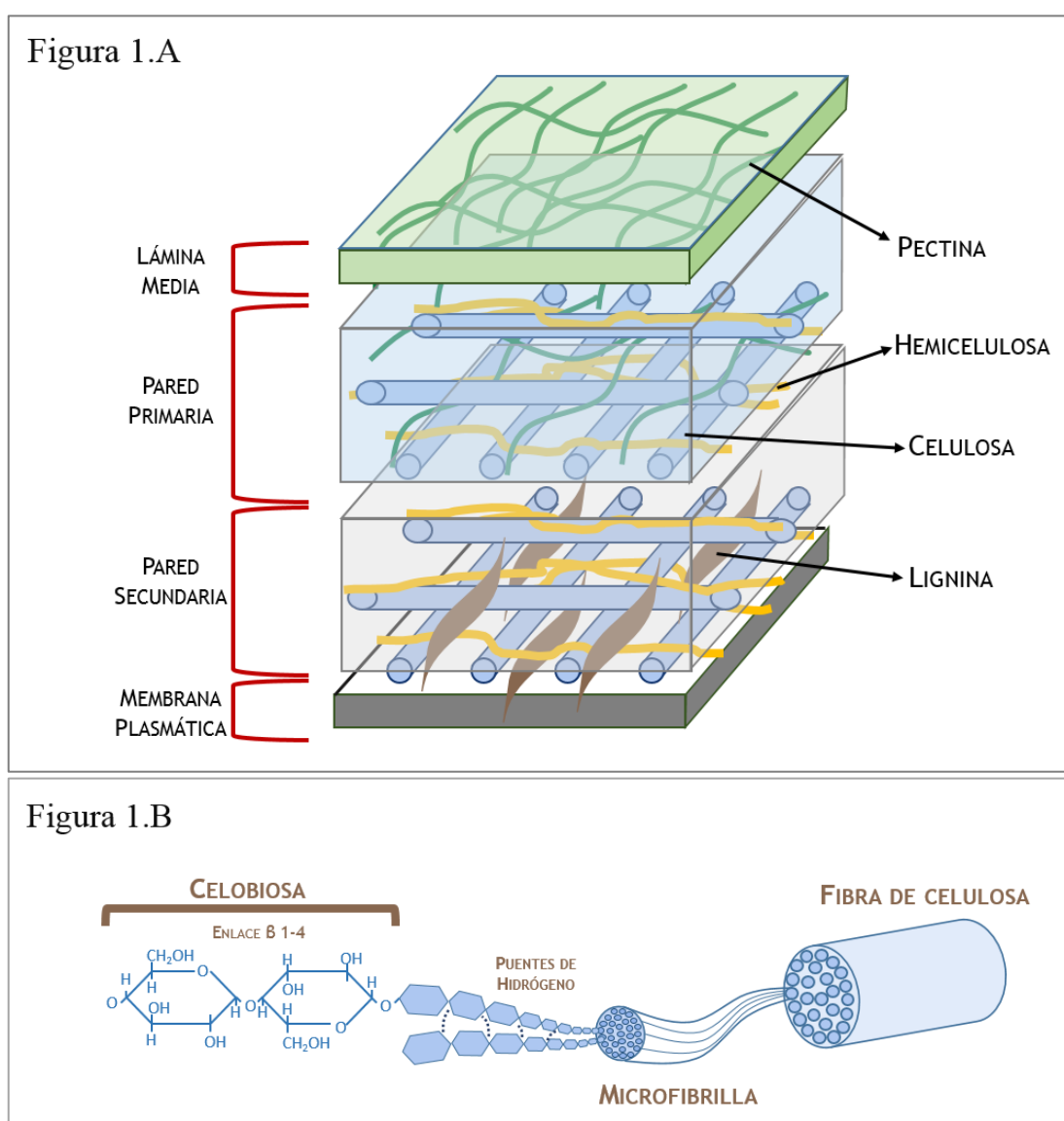


Figura 1. A- Estructura de la pared vegetal. **B-** Estructura de una fibra de celulosa.

Entre los residuos lignocelulósicos que se generan anualmente se encuentran los residuos agroalimentarios procedentes de las industrias alimentarias, siendo las empresas de zumos interesantes productores de residuos a revalorizar. Entre estos

residuos de zumos destacan los residuos de naranja. En la actualidad se producen 73,31 millones de toneladas de naranja cada año, de los cuales, 18,46 millones son empleados para la fabricación de zumos y mermeladas [23]. Del total de la producción de naranjas, la mitad constituye residuos que no pueden ser empleados para la alimentación humana, constituidos principalmente por un 80-90 % de humedad y un alto contenido en materia orgánica. El principal destino de estos residuos es su uso para alimentación animal, compostaje, incineración o acumulación en vertederos. De estas opciones, emplear los residuos de naranja para compostaje o su acumulación en vertederos no son buenas opciones, ya que el alto contenido en agua, en materia orgánica y azúcares libres, además del bajo pH suele desencadenar en fermentaciones no deseadas y crecimiento microbiano de patógenos. Por otro lado, la incineración de estos residuos contribuye a la emisión de gases del efecto invernadero, que contaminan la atmósfera y contribuyen al cambio climático. Por tanto, emplear este tipo de residuos en alimentación animal sería la única opción respetuosa con el medio ambiente, para la eliminación de las cáscaras, pulpa y semillas de naranja, pero con una escasa rentabilidad económica. A causa de esto, los residuos de naranja han generado un gran interés por su enorme potencial para revalorización en las biorrefinerías, debido a su alto contenido en carbono y nutrientes, además de los problemas que origina su eliminación [23,24]. El presente trabajo se centra en el empleo de estos residuos agroalimentarios. En el Anexo de esta memoria se recoge la Publicación 1, una revisión bibliográfica donde se expone el potencial de los residuos de naranja y su revalorización en las biorrefinerías.

La biomasa lignocelulósica tiene un gran potencial como fuente de carbono alternativa al petróleo y su empleo en biorrefinerías ha generado el desarrollo de múltiples aplicaciones, como ya se ha comentado. En particular, es interesante la revalorización de las diversas fracciones de este tipo de residuos por vía fermentativa para producir compuestos de alto valor añadido. La producción de cualquier tipo de compuesto por esta vía, ya sea biocombustibles, biopolímeros o cualquier otro producto, depende del microorganismo empleado que, a partir de un caldo concentrado en azúcares fermentables, es capaz de transformarlo en el producto final. Para obtener ese caldo rico en azúcares la biomasa debe ser pretratada e hidrolizada [29, 30]. Por tanto, el proceso de revalorización de biomasa implica un pretratamiento de la materia prima, una hidrólisis de los polisacáridos que componen dicha materia prima y, por

último, una etapa de fermentación donde se lleva a cabo la producción del compuesto final de interés.

En primer lugar, el pretratamiento tiene la finalidad de favorecer la accesibilidad de las enzimas y retirar la presencia de inhibidores enzimáticos y/o del microorganismo, para que en las etapas posteriores se maximicen los rendimientos. Este tipo de operación se realiza debido a la resistencia que ofrece este tipo de residuos a la hidrólisis enzimática. Tras el pretratamiento, para poder transformar la biomasa en cualquier producto de alto valor añadido, se requiere de una etapa de hidrólisis de celulosa y hemicelulosas para liberar los monosacáridos y ácidos derivados de estos que constituyen dichos polímeros. Para poder hidrolizar los polímeros de celulosa y hemicelulosa presentes en la biomasa lignocelulósica se emplea distintos tipos de procesos, entre los que se encuentran los que utilizan enzimas (celulasas y hemicelulasas) que liberarán al caldo una mezcla de hexosas y pentosas. Por último, tendrá lugar la etapa de fermentación, que transformará esos azúcares en el producto final.

Por tanto, el aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica por fraccionamiento requiere de tres etapas, debido a la compleja estructura de la materia prima y al carácter recalcitrante que presenta. Estas etapas, actualmente, se encuentran en desarrollo, por lo que la revalorización de biomasa lignocelulósica todavía necesita mejoras considerables antes de que sea un proceso eficiente y económicamente viable [21-33].

2.1. Pretratamientos

Los principales objetivos del pretratamiento son: reducir el contenido en celulosa cristalina para incrementar el área de superficie de acceso a las enzimas; despolimerizar parcialmente la celulosa y hemicelulosa; retirar o reducir el contenido en lignina y hemicelulosa; aumentar la superficie de material expuesta a la acción de las enzimas, minimizar la pérdida de azúcares; evitar la formación de compuestos tóxicos que puedan inhibir las enzimas o afectar al microorganismo en la posterior fermentación; y minimizar los costes de operación [27, 31, 33].

En la literatura se han propuesto diversos tipos de pretratamientos para maximizar el rendimiento de azúcares en la etapa posterior de hidrólisis. Estos pretratamientos se adecuan al tipo de materia prima que se emplea, ya que, como se

ha comentado, existe una amplia variedad de residuos. En función de la composición y estructura de la biomasa lignocelulósica se requiere un tipo de pretratamiento u otro. Los diferentes pretratamientos descritos en literatura se pueden clasificar, en función de la tecnología empleada en: físicos, químicos, físico-químicos y biológicos. Cada uno de ellos presenta ventajas e inconvenientes particulares, por lo que, a veces, es necesario recurrir a una combinación de varios tipos de pretratamientos. En la **Tabla 2** se puede observar los diferentes pretratamientos propuestos y una breve descripción de cada uno de ellos [27, 31, 33].

2.2. Hidrólisis enzimática

2.2.1. Enzimas responsables de la hidrólisis

Las enzimas empleadas para llevar a cabo la hidrólisis se obtienen de los organismos celulolíticos, capaces de degradar lignina, celulosa y hemicelulosa. Muchas especies de hongos y algunas bacterias, de manera natural, son capaces de alimentarse de biomasa lignocelulósica para lo que han desarrollado diferentes mezclas enzimáticas capaces de liberar la glucosa de cualquier tipo de biomasa. Dependiendo de la especie de hongo, éste estará adaptado a la degradación de uno u otro tipo de residuo por lo que las mezclas de enzimas que será capaz de producir serán distintas. De la misma manera, se pueden encontrar hongos adaptados a distintas temperaturas, pH, u otras condiciones. Gracias a la gran diversidad de microorganismos que existen en la naturaleza, se dispone de un amplio catálogo de enzimas que se pueden emplear para la revalorización de biomasa mediante un paso intermedio de hidrólisis [34]. Dentro de las bacterias capaces de producir enzimas se pueden destacar géneros como *Cellulomonas* [35, 36], mientras que también existen varias especies de hongos celulolíticos pertenecientes a los géneros *Trichoderma*, *Penicillium* y *Aspergillum* [37-40].

La producción enzimática a nivel industrial actualmente es demasiado cara, por lo que muchas investigaciones están dirigidas a la optimización de este proceso para abaratar los costes mediante la mejora del proceso o bien la mejora genética del organismo empleado en la producción de estas enzimas [41, 42].

Tabla 2. Descripción de los principales pretratamientos desarrollados para biomasa lignocelulósica.

TIPO DE PRETRATAMIENTO		DESCRIPCIÓN
Pretratamientos Físicos	Trituración mecánica	El objetivo principal es reducir el tamaño de partícula y la celulosa cristalina para incrementar la superficie de acceso. Este proceso implica alto consumo de energía.
	Extrusión	Combina la temperatura con el cizallamiento. El objetivo es despolimerizar el material y acortar las fibras de celulosa.
Pretratamientos Químicos	Ácido	Se emplean ácidos como clorhídrico, nítrico o fosfórico. El objetivo es solubilizar la hemicelulosa para facilitar el acceso de las enzimas a la celulosa. Puede haber pérdida de azúcares fermentables e implica altos costes a gran escala.
	Alcalino	Se emplean bases como el hidróxido de sodio, potasio, calcio o amonio. El objetivo es atacar principalmente a la lignina para favorecer la digestibilidad. Puede haber pérdida de azúcares fermentables e implica altos costes a gran escala.
	Ozonólisis	La biomasa se trata con ozono como agente oxidante para la lignina. Este proceso implica altos costes por que requiere altas cantidades de ozono.
	Organosolv	Emplea solventes orgánicos como metanol, acetona o etilenglicol. Es capaz de hidrolizar la lignina y la hemicelulosa. Se requiere el reciclado de estos solventes.
	Líquidos Iónicos	Formados por sales (anión más catión), que permite desarrollar distintos tipos de estos líquidos iónicos. Implica altos costes y requiere reutilizar el líquido.
Pretratamientos Físico-Químicos	Explosión por vapor	Reduce la lignina y solubiliza la hemicelulosa, pero genera compuestos tóxicos y se degrada parte de la hemicelulosa.
	Hidro-térmico	No requiere reducir el tamaño de partícula, ni emplear compuestos químicos por lo que no necesita materiales resistentes a la corrosión. Requiere altas cantidades de energía y agua y puede formar compuestos tóxicos.
	CO ₂ supercrítico	Incrementa la superficie de acceso a las enzimas y favorece la hidrólisis de celulosa. Implica bajos costes y se recupera fácilmente, además no es peligroso para el medio ambiente. Implica usar altas presiones y no afecta a la lignina y hemicelulosa.
	AFEX (ammonia fiber explosión)	Reduce la celulosa cristalina y retira pequeñas cantidades de lignina y hemicelulosa. No es muy eficiente para biomasa con mucha lignina e implica altos costes en amonio.
	Microondas	Cambia la estructura de la biomasa lignocelulósica favoreciendo el acceso a las enzimas. Emplea procesos de operación sencillos: tiempos cortos, poca energía y generación de tóxicos mínima.
Pretratamientos Biológicos	Emplea microorganismos celulolíticos capaces de deslignificar y reducir el grado de polimerización de la celulosa. Además, requiere poca cantidad de energía y es respetuosa con el medio ambiente. El desarrollo del proceso es lento por lo que no es aplicable aún en aplicaciones comerciales.	

Las enzimas responsables de la hidrólisis se pueden clasificar atendiendo al polímero que degrada y la actividad que presenta [20, 34]:

- **Enzimas que degradan la celulosa.** Para degradar el polímero de celulosa se necesitan enzimas capaces romper los enlaces glucosídicos β (1-4) que componen la estructura. Para ello se requiere actividad **celobiohidrolasa** capaz de atacar los extremos de la celulosa, liberando moléculas de celobiosa. Las enzimas con actividad **endoglucanasa** rompen la celulosa por puntos del interior de la cadena reduciendo el grado de polimerización de la celulosa y reduciendo su tamaño. Por último, las **β -glucosidasas** se encargan de escindir la molécula de celobiosa para liberar dos moléculas de glucosa.

- **Enzimas que degradan la hemicelulosa.** Debido a la complejidad de este polímero y que su composición es muy variada dependiendo del residuo, se encuentran un amplio número de enzimas como: endoxilanasas, xiloglucanasas, β -xilosidasas, α -galactosidasas y α -glucuronidasas. El producto de estas reacciones sería una mezcla de azúcares que incluye xilosa, arabinosa, galactosa y otro tipo de compuestos como ácido acético.

- **Enzimas que degradan la pectina.** En este grupo de enzimas cabe destacar las poligalacturonasas ya que este polímero está constituido principalmente por ácido galacturónico. Además, también actúan pectin-metil esterasas, pectin liasa o ramnogalacturonano liasas, liberando otros glúcidos presentes en el polímero.

- **Enzimas que degradan la lignina.** Las lacasas o magnesio peroxidasas son las enzimas responsables de la hidrólisis de la lignina, que se lleva a cabo por un proceso complejo.

2.2.2. Factores que afectan a la hidrólisis enzimática

Para llevar a cabo la hidrólisis enzimática es importante conocer la composición, estructura y morfología del residuo, tanto para la elección del pretratamiento como para la propia hidrólisis. En primer lugar, se debe conocer el contenido en lignina de la materia prima, ya que este polímero actúa de barrera frente a agentes extraños de tal forma que protege la celulosa de la degradación por microorganismos. De la misma manera, la lignina va suponer un obstáculo para que las enzimas accedan a la celulosa y puedan hacer su trabajo. Además, se ha demostrado que no solo actúa como barrera,

si no que atrapa las celulasas inhibiendo su acción. También el contenido en hemicelulosa afecta a la hidrólisis, porque actúa como pegamento de las distintas fibras de celulosa generando un entramado bastante resistente. Por tanto, degradar o retirar la hemicelulosa del residuo facilita el acceso de las enzimas a la celulosa, mejorando así los rendimientos. Por otro lado, la celulosa cristalina y ordenada también es más difícil de hidrolizar que la celulosa amorfa, ya que el orden de las fibras de celulosa restringe el espacio y el acceso a las enzimas. A causa de esto la mayoría de los pretratamientos están dirigidos precisamente a retirar la lignina y despolimerizar la hemicelulosa, todo con el objetivo de incrementar el área y la superficie disponible para que actúen las enzimas. Por último, también es importante el tamaño de partícula con el que se trabaje y el tamaño de poro del material. Generalmente aquellos materiales más porosos tienen mayor superficie de ataque de las enzimas. Como se puede ver, tanto la estructura y la morfología del material son factores claves que influyen directamente sobre el rendimiento de la hidrólisis enzimática. Para solventar estos problemas, se han desarrollado distintos tipos de pretratamientos que modifican la estructura y composición del residuo. Por tanto, la elección del pretratamiento es fundamental en el proceso de hidrólisis [27, 31, 33, 43].

No solo es determinante el tipo de residuo con el que se trabaja, sino que también son claves las enzimas que se emplean. Las enzimas celulolíticas van tener unas condiciones de operación óptimas, y algunas limitaciones para trabajar con ellas. Para obtener rendimientos y velocidades de reacción altas, muchos estudios se han centrado en conocer y optimizar todas las variables que pueden estar influyendo. En cuanto a las condiciones de operación óptimas, que se encuentran en literatura, son alrededor de 50 °C en el caso de la temperatura y un pH de 4,8 [44-46]. La concentración de sustrato inicial presente en la reacción también puede afectar a la actividad de las enzimas, ya que altas concentraciones de sustrato pueden causar inhibición. Además, también se ha visto que estas enzimas presentan inhibición por producto, es decir, altas concentraciones de glucosa o celobiosa inhiben la reacción. Para hacer viable este tipo de procesos, generalmente se buscan altas concentraciones de azúcares finales, que se consiguen con altas cargas de sustrato inicial, por lo que muchas estrategias se han desarrollado para solventar estos problemas como trabajar en *fed-batch* o en SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation* del inglés, fermentación y sacarificación simultánea) y buscar nuevas enzimas con mayor estabilidad [47-51].

Por otro lado, también se ha visto que las celulasas pierden actividad con el tiempo, ya que la propia celulosa atrapa estas enzimas de manera irreversible, por lo que incrementar la dosis de enzima conlleva mejores rendimientos en la concentración final de azúcares [27, 31, 33, 43].

Como se puede ver, los procesos de revalorización de biomasa tienen importantes desafíos en los próximos años que radican en el desarrollo de procesos de producción enzimática más baratos, búsqueda de enzimas que sean más estables y activas, sin olvidar la importancia del pretratamiento que también requiere reducir sus costes.

3. Producción de Ácido Láctico

3.1. Ácido láctico: Síntesis Química vs Biotecnológica

El ácido láctico es uno de los ácidos orgánicos más importantes debido a su amplio espectro de aplicaciones en la industria. Fue descubierto por Carl Scheele en 1780, que lo aisló por primera vez a partir de leche agria, aunque fue Lavoisier quien le asignó el nombre de *acide lactique*. Desde entonces, el ácido láctico fue considerado un componente de la leche, hasta que, en 1857, Pasteur demostrase que se trata de un metabolito producto de la fermentación de azúcares de la leche [52]. Como se puede ver en la **Figura 2**, el ácido láctico está formado por tres carbonos, siendo el carbono 2 quiral, y que da lugar a dos enantiómeros: ácido D-láctico y ácido L-láctico. Además, cuenta con un grupo ácido carboxílico y un grupo hidroxilo, lo que le hace susceptible de múltiples reacciones y precursor de muchos productos químicos que se detallarán más adelante [53, 54].

El ácido láctico, en la naturaleza, puede ser producido tanto por mamíferos, que solo producirían el isómero L, como por microorganismos, que son capaces de producir ambos isómeros puros, o mezclas racémicas. Por otro lado, también se puede obtener ácido láctico mediante síntesis química, obteniéndose la mezcla racémica de ácido D- y L- láctico [55, 56]. Cada isómero tiene aplicaciones distintas en la industria. Sin embargo, las propiedades físicas de ambos (punto de fusión, solubilidad, constante de disociación, etc.) son bastante parecidas, lo que da lugar a que la separación de ambos isómero sea bastante complicada y costosa; por lo que el isómero puro tiene más valor en el mercado que la mezcla racémica de ambos [57]. Por este motivo, la

producción de ácido láctico por vía biotecnológica es más atractiva que la síntesis química; de hecho, prácticamente todo el ácido láctico que se produce en el mundo, se obtiene mediante fermentación microbiana [58]. Además de rendir el isómero puro, la producción biotecnológica presenta otras ventajas. La fermentación láctica, llevada a cabo por microorganismos, permite el uso de fuentes renovables como materia prima, temperaturas y presiones de operación suaves y, por tanto, un bajo consumo de energía, mientras que, para la síntesis química, se necesitan precursores derivados del petróleo, siendo las condiciones de operación más severas y, por tanto, mayor gasto energético, además de que contribuye a la problemática medioambiental de la industria del petróleo [59]. La **Figura 3** recoge las etapas principales de ambas producciones.

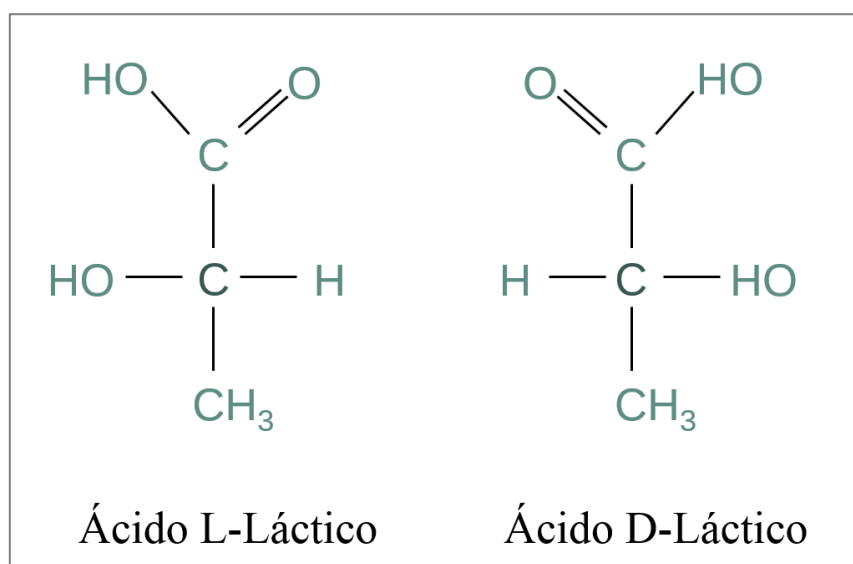


Figura 2. Molécula de ácido láctico en sus dos isómeros.

La **síntesis química** parte del acetaldehído, al que se le añade cianuro de hidrógeno para obtener, en presencia de una base, lactonitrilo. La reacción tiene lugar en fase líquida y a altas presiones. El lactonitrilo se recupera por destilación y se hidroliza a ácido láctico y sal de amonio por la adición de ácido sulfúrico concentrado o ácido clorhídrico. Por último, la purificación del producto se lleva a cabo por destilación, donde el ácido láctico es esterificado con metanol, para posteriormente hidrolizarlo con agua. Como resultado se obtiene una mezcla de ácido D- y L- láctico [52].

La **producción biotecnológica** parte de residuos renovables o biomasa como materia prima, que tras un pretratamiento y una hidrólisis liberará azúcares fermentables. El microorganismo elegido como biocatalizador, transformará los azúcares en ácido láctico. El producto final será ácido D-láctico o ácido L-láctico dependiendo del microorganismo empleado [60].

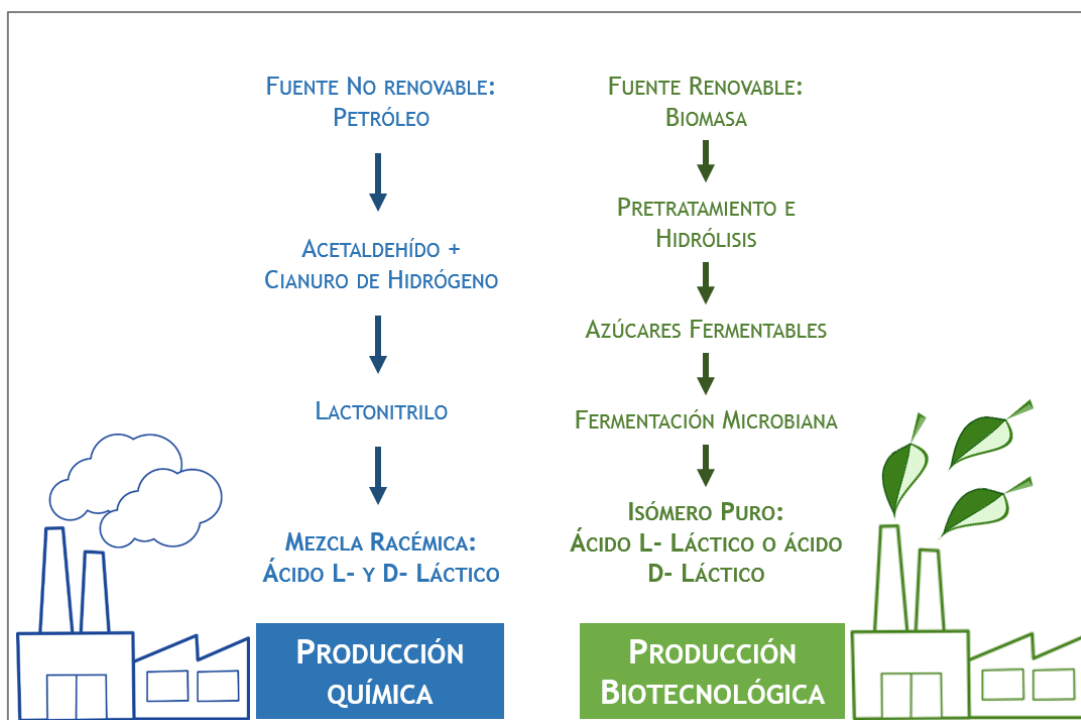


Figura 3. Etapas de la síntesis química y biotecnológica de ácido láctico.

3.2. Aplicaciones del ácido láctico

El uso del ácido láctico en la **Industria Alimentaria** es una de las aplicaciones más tradicionales y conocidas. Se emplea principalmente como saborizante y para alargar la vida del alimento, al inhibir el crecimiento de microorganismos que podrían alterar las características organolépticas. Con esta finalidad, el ácido láctico se emplea para conservar carnes, o incluso para desinfectar los envases de esos productos cárnicos. También se emplea para la conservación de productos encurtidos o para verduras y frutas en conserva. En panadería y bollería también se usa como emulsionante y aporta estabilidad a las masas fermentadas, además, es el responsable del color de la corteza del pan. En bebidas como zumos, bebidas carbonatadas, cerveza

o vino se emplea como acidulante y saborizante. Por último, en los productos lácteos y sus derivados, es donde el ácido láctico tiene una gran importancia para producir quesos, yogures o requesones entre otros [58, 61]. El ácido láctico también ofrece una amplia gama de aplicaciones en la **Industria Cosmética**, donde, al ser un ingrediente natural, encaja perfectamente con la tendencia actual hacia formulaciones que no incluyan aditivos sintéticos. Principalmente se emplea como humectante y regulador del pH, pero se ha visto que tiene otras propiedades que ofrecer en este sector: el efecto hidratante, que se relaciona con la capacidad de retener agua del lactato; aclarador de la piel, ya que el ácido láctico suprime la formación de tirosinas (precursores de la melanina en la piel); además se emplea como alternativa más suave al ácido glicólico, y se comercializa como producto químico anti-edad, que suaviza las líneas de expresión y reduce el daño de exposición al sol [61]. La **Industria Farmacéutica** emplea el ácido láctico como electrolito en sueros intravenosos para reponer fluidos corporales, además de aprovechar su propiedad antimicrobiana y emplearlo como desinfectante. Por otro lado, las sales del ácido láctico presentan ventajas como buena absorción, solubilidad y se metabolizan fácilmente por lo que se emplean para la formulación y administración de muchos medicamentos [61].

Para las aplicaciones descritas hasta ahora se emplea el isómero L- de ácido láctico, ya que es el que puede metabolizar el ser humano y animales, de hecho, cantidades altas del isómero D- podrían ser peligrosas para la salud. Estas aplicaciones son las más tradicionales, pero hace relativamente poco tiempo se han descrito nuevas aplicaciones que han revolucionado el mercado y la demanda de ácido láctico.

En la **Industria Química** el ácido láctico se ha empleado como desincrustante, para desinfectar superficies y tuberías, como regulador de pH o agente neutralizante, entre otras. Actualmente se ha descrito la producción de compuestos químicos a partir de ácido láctico, que hasta ahora se obtenían del petróleo llegando a considerarse el ácido láctico como un producto químico de base [58]. En la **Figura 4** se puede observar los diferentes compuestos que se pueden sintetizar a partir del ácido láctico. Entre estos compuestos, encontramos químicos muy útiles como el ácido acrílico, usado en pinturas y adhesivos, además de ser un aglutinante en la industria textil y del papel; síntesis de ácido pirúvico, que actúa de precursor de algunos aminoácidos; para la elaboración de disolventes limpios basados en el etil-lactato; o para elaborar 1,2-propanodiol que actuaría como anticongelante [54, 55, 58, 62]. Además, el ácido

láctico también se puede emplear como monómero para sintetizar ácido poliláctico (*polylactic acid*, PLA), un polímero biodegradable.

Por tanto, en las últimas décadas, el ácido láctico está ganando interés en la industria química debido al amplio número de posibles aplicaciones que ofrece. Sin embargo, esta tecnología está aún en desarrollo, y tiene por delante el reto de reducir los costes de producción [59, 61].



Figura 4. Diferentes compuestos que se pueden sintetizar a partir de ácido láctico.

3.3. Mercado actual del ácido láctico

Actualmente, el ácido láctico que se comercializa es al 88 % de pureza para todo tipo de aplicaciones, y el precio varía según el mercado entre 1,3 \$/kg a 2,3 \$/kg. Se ha calculado que la demanda mundial de este ácido es de 1.200 kt en 2016, estimando un crecimiento de 16,2 % cada año hasta 2025, llegando a representar 9,8 billones de dólares americanos en el mercado mundial. Este crecimiento se explica por las nuevas aplicaciones descritas, que demandan grandes cantidades de ácido láctico principalmente en la industria cosmética. Por otro lado, la preferencia de los consumidores por envases ecológicos y que cada vez hay una mayor conciencia social por los problemas medioambientales, implica que cada vez haya más empresas que empleen plásticos biodegradables, como los PLAs, lo que implica un crecimiento en la demanda de ácido láctico [58, 63].

En lo que respecta a la comercialización del ácido láctico, encontramos que desde principios de siglo han ido apareciendo nuevas empresas que han invertido en I+D para mejorar el proceso y cubrir la demanda de ácido láctico, adaptándose al mercado actual. La mayoría de ellas trabajan con biomasa de primera generación como caña de azúcar, almidón de maíz o el trigo, por lo que se busca la manera de sustituir esta materia prima por biomasa lignocelulósica de segunda generación. Algunos ejemplos de estas empresas serían: Corbion-Purac (Países Bajos), que suministra ácido láctico a diferentes sectores como alimentario farmacéutico o para síntesis de PLA, entre otros; Galactic (Bélgica) que es una de las empresas líderes en biotecnología que lleva operando más de 20 años; y NatureWorks LLC (EE. UU) que se considera líder mundial en la producción de ácido láctico [58, 63]. Por último, Musachino Chemical Laboratory (Tokio), es una empresa que elabora el 2 % del ácido láctico que se comercializa en el mundo, y es la única empresa que lo hace por síntesis química, rindiendo mezclas racémicas del producto, ya que el resto de compañías emplean la vía biotecnológica [58, 63].

3.4. Polímeros del ácido láctico (PLAs)

Los polímeros del ácido láctico o PLAs son polímeros biodegradables y muy versátiles, lo que permite que tenga un amplio número de aplicaciones. Están formados a partir del ácido láctico que, como se ha visto, se sintetiza por vía biotecnológica a partir de fuentes renovables [64]. Partiendo del ácido láctico, la síntesis puede llevarse a cabo de tres maneras distintas: polimerización por condensación directa, por condensación en una solución azeotrópica, o bien, por polimerización de lactidas, dímeros cíclicos de ácido láctico. Esta última forma de sintetizar PLA se conoce como *Ring opening polymerization* donde el primer paso es la síntesis de lactidas. Estos dímeros o lactidas pueden estar constituidos por el mismo isómero de ácido láctico dando lugar a L-lactida o D-lactida, o bien por ambos, resultando en L,D-lactida, también llamada meso-lactida [58, 65]. Tras la purificación de estas lactidas se lleva a cabo la polimerización por apertura de anillo, dando lugar a ácido poli L-láctico (*poly-L-lactic acid*, PLLA), ácido poli D-láctico (*poly-D-lactic acid*, PDLA) y ácido poli L,D-láctico (*poly-L,D-lactic acid*, PLDLA). Actualmente se utiliza el método de polimerización de lactidas, ya que permite obtener polímeros de alto peso molecular y, durante el proceso, no se generan residuos tóxicos, ya que no se emplean

disolventes, al contrario que en los otros dos métodos de síntesis de PLAs [66]. Los polímeros sintetizados a partir de isómeros puros presentan una estructura cristalina, mientras que aquellos polímeros sintetizados a partir de la meso-lactida presentan una estructura amorfa [64, 67].

Estos bioplásticos se descubrieron en 1932 por Carothers, quien sintetizó PLA de bajo peso molecular. Posteriormente se consiguió incrementar el peso molecular y, en 1974, se comercializaron los PLAs combinados con ácido poliglicólico, como material de sutura en Estados Unidos. Debido a los costes de producción, las primeras aplicaciones de estos plásticos se ceñían a la industria farmacéutica y para aplicaciones médicas. Más tarde, a partir de los 90, que fue cuando se implantó la producción biotecnológica del ácido L-láctico a un bajo coste, las aplicaciones se expandieron a otros sectores. Además, estos primeros PLA estaban constituidos por L-lactida, ya que había, y hay, un mayor desarrollo en la tecnología de producción del isómero L- [64, 68, 69]. En 1987 se descubrió que la mezcla entre PLLA y PDLA daba lugar a estereocomplejos de PLA que presentaban mejor estabilidad térmica, mayor resistencia y elongación a la tracción [64, 70]. Fue en este momento cuando la síntesis de plásticos a partir del isómero D- del ácido láctico comenzó a tener un gran interés para aplicaciones habituales. La **Figura 5** muestra las entradas de búsqueda que aparecen para cada uno de los isómeros del ácido láctico, desde la década de los 60. Como se puede ver en la figura, fue en los años 90 cuando comenzó a crecer el interés por el isómero D-láctico, coincidiendo con el descubrimiento de que los estereoisómeros de PLLA y PDLA aportan mejores propiedades a los plásticos. En la última década se puede ver como el número de entradas científicas se equipara para ambos isómeros. Sin embargo, mientras que la tendencia de crecimiento para los estudios del isómero D-láctico es exponencial, la evolución de los estudios en el isómero L-láctico parece haberse detenido.

Estos plásticos están ganando tanto interés porque son respetuosos con el medio ambiente, se pueden sintetizar a partir de fuentes renovables y son biodegradables, además de que su producción requiere entre un 25 y 55 % menos de energía que los plásticos que derivan del petróleo. Por otro lado, y debido a su estructura, los PLAs permiten una amplia gama de posibles modificaciones, lo que le confiere una gran adaptabilidad en el mercado a la aplicación requerida. Por esto, actualmente se están desarrollando mezclas de PLAs con otros polímeros, lo que permite mejorar las

propiedades del polímero resultante. Además, este tipo de biopolímeros son considerados seguros para estar en contacto con alimentos por la Administración de drogas y servicios (FDA, *Food and Drug Administration*). Aunque debido a los costes de producción en sus inicios, este tipo de biopolímeros eran exclusivos para su uso en aplicaciones médicas, actualmente se ha extendido a otras áreas como su uso para el envasado de alimentos, o emplearlo para cubrir algunas superficies como el interior de vehículos o para la fabricación de cascos de seguridad, entre otros [71, 72].

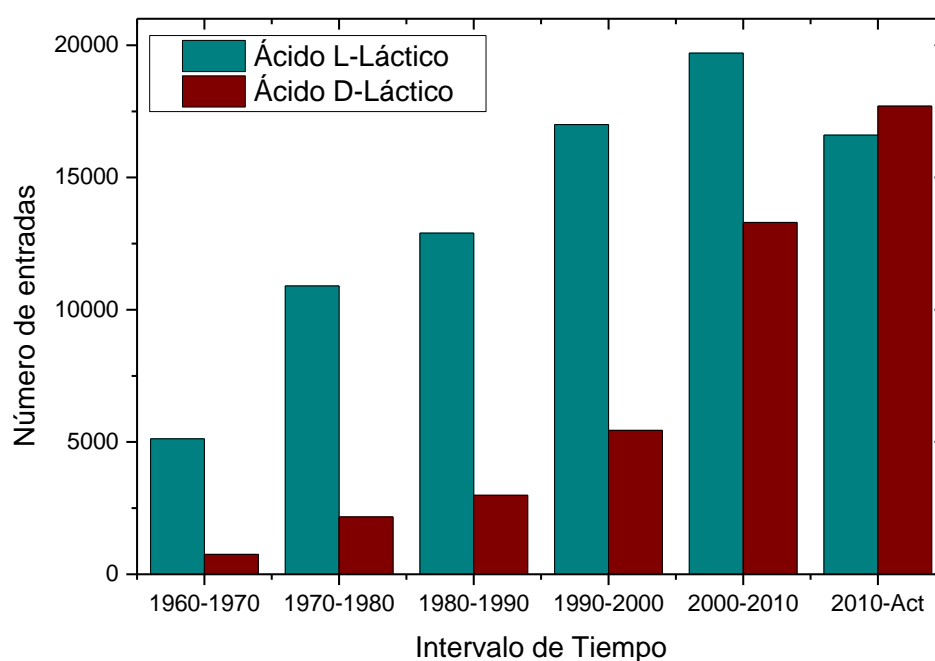


Figura 5. Número de entradas que aparecen en "Google Scholar" para "L-lactic acid" o "L-lactate" (azul) o bien "D-lactic acid" o "D-lactate" para las décadas indicadas. Búsqueda realizada el 23-4-2019.

Sin embargo, este tipo de tecnología requiere continuar desarrollándose para adaptarse al mercado actual, incrementando las aplicaciones de estos biopolímeros y reduciendo los costes de producción para que sea más competitiva. En la actualidad, el consumo y no reciclado de plásticos que no son biodegradables está generando un grave problema medioambiental, por tanto, los PLAs se postulan como uno de los mejores candidatos a sustituir a los plásticos derivados del petróleo, por lo que se prevé un incremento en la demanda del ácido láctico.

4. Producción Biotecnológica de ácido láctico

Como se ha comentado, la producción de ácido láctico se ha llevado a cabo mediante vía biotecnológica durante muchos años, por las ventajas que ofrece frente a la síntesis química, por lo que es un proceso que está bien establecido, a un coste relativamente bajo para las aplicaciones más tradicionales del ácido láctico. Sin embargo, con las nuevas aplicaciones descritas, se abre la posibilidad de que el ácido láctico sustituya a las moléculas provenientes petróleo como precursor de algunos compuestos químicos, como los plásticos. Actualmente, el precio de los plásticos derivados del petróleo es más bajo que su análogo biosostenible, y lo mismo ocurre con el resto de compuestos químicos. Por lo que, la obtención biotecnológica de ácido láctico tiene por delante el reto de reducir los costes de producción, y así, poder competir en el mercado con los procesos productivos tradicionales.

4.1. Microorganismos productores de ácido láctico

La producción biotecnológica de ácido láctico es llevada a cabo por un amplio grupo de bacterias conocido como bacterias lácticas o bacterias del ácido láctico (*lactic acid bacteria*, LAB). Este grupo incluye los géneros *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* y se caracterizan por ser cocos Gram +, a excepción de los géneros *Lactobacillus* y *Carnobacterium*, que son bacilos Gram +. Las LAB son incapaces de sintetizar ATP mediante la respiración, por lo que la mayoría son anaerobias facultativas, además de catalasa negativa, sin movilidad e incapaces de formar esporas. El producto principal de su metabolismo es el ácido láctico, por lo que son capaces de sobrevivir en ambientes con un pH de 5 o incluso inferiores, lo que les da una ventaja adaptativa frente a otras bacterias. La temperatura óptima de crecimiento puede variar de 30 °C a 45 °C, dependiendo del género, y se encuentran de forma natural en ambientes con un alto nivel nutritivo, ya que las LAB tienen limitada la capacidad de sintetizar vitaminas y aminoácidos [73].

Las bacterias lácticas se pueden dividir en dos grupos principales, en función del tipo de metabolismo que presentan. Por un lado, existen bacterias lácticas heterofermentativas o heterolácticas, que metabolizan los azúcares por la ruta de las pentosas fosfato y donde el producto final es ácido láctico, dióxido de carbono y etanol

o ácido acético. Por otro lado, están las bacterias lácticas homofermentativas u homolácticas, cuyo producto principal es el ácido láctico obtenido por la vía Embden-Meyerhoff o glicolítica, en la cual, a partir de la glucosa se obtienen dos moléculas de piruvato, y este será transformado a ácido láctico [59, 73]. Este último grupo es el que se emplea para producir ácido láctico a escala industrial, ya que el rendimiento en ácido láctico es mayor y la purificación más sencilla. Algunas de las bacterias homofermentativas son capaces de fermentar las pentosas por la vía de las pentosas fosfato, mientras que las hexosas serán fermentadas a ácido láctico por la vía glicolítica, conocidas como heterofermentativas facultativas [73]. De la misma manera, algunas bacterias homofermentativas estrictas, en condiciones donde limita la glucosa, son capaces de activar la ruta ácido mixta donde se puede obtener etanol, fórmico, acético y láctico. Tanto la ruta de las pentosas fosfato, como la ruta Embden-Meyerhoff se muestra en la **Figura 6**, y la presencia de una u otra dependerá del género y de la especie [73]. Las principales ventajas de este grupo homofermentativo radican en el crecimiento rápido de las bacterias y en la obtención de rendimientos altos en ácido láctico, lo que se traduce en una productividad elevada. Además, dentro de este grupo se pueden encontrar cepas capaces de producir uno u otro isómero del ácido láctico con una pureza superior al 90 % sin necesidad de recurrir a la ingeniería genética [59].

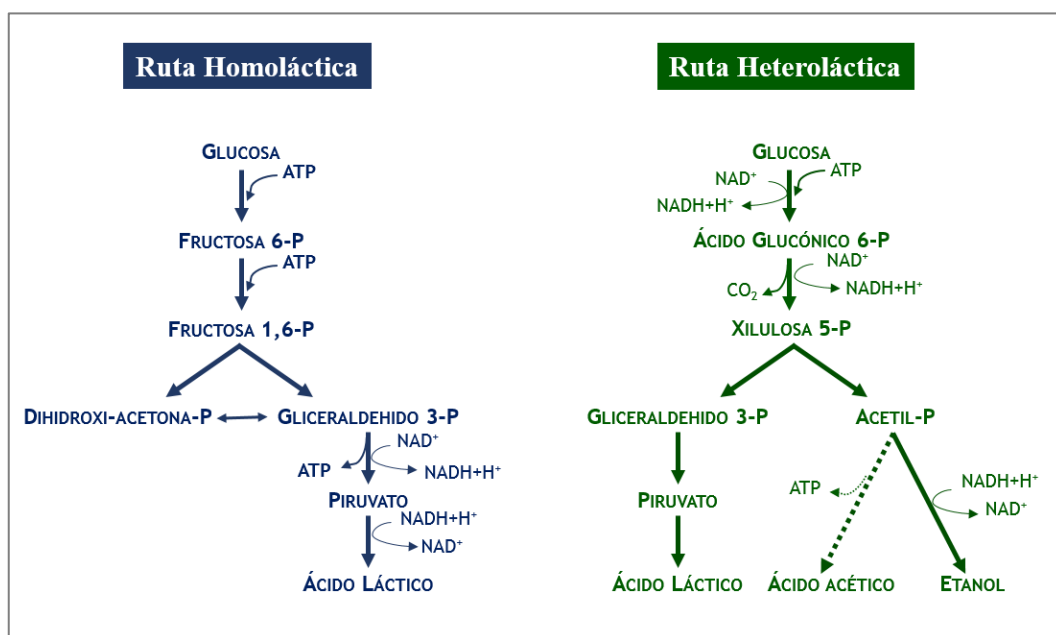


Figura 6. Rutas metabólicas de las bacterias productoras de ácido láctico (LAB).

Además de este grupo tan extenso de bacterias, se encuentra en la literatura la producción de ácido láctico con otros microorganismos que no pertenecen al grupo de bacterias lácticas, e incluye tanto bacterias, como levaduras y hongos. Entre los microorganismos más empleados, además de las LAB, se encuentran diferentes especies del género *Bacillus*. Este género, a diferencia de las bacterias lácticas, no necesita medios de cultivo complejos con alto contenido nutricional en vitaminas y fuente de nitrógeno, por lo que su uso, abarataría los costes de producción. También *Escherichia coli* y *Clostridium glutamicum*, ambas modificadas mediante técnicas de ingeniería genética, se han empleado para producir ácido láctico, ya que son bacterias que crecen rápido y fáciles de manipular genéticamente para producir el isómero puro, ya sea D- o L-. Algunos hongos del género *Rhizopus* también han llamado la atención para la producción biotecnológica, ya que tienen actividad amilolítica, lo que mejoraría el aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica y no se necesitarían pasos previos de hidrólisis, abaratando costes. Las levaduras también se han considerado para llevar a cabo la producción de ácido láctico, ya que también son microorganismos que pueden tolerar pH muy bajos, evitando así el uso de agentes neutralizantes. Las levaduras producen este ácido orgánico en cantidades muy bajas, ya que su principal producto es el etanol, por lo que se han desarrollado diferentes cepas modificadas capaces de producir el ácido láctico. Por último, el empleo de microorganismos fotosintéticos como microalgas o cianobacterias, tienen un gran interés no solo para la producción de ácido láctico sino también su aplicación en biorrefinerías para obtener otros productos. Esto es por su capacidad de fijar dióxido de carbono, a partir del cual sintetizan y acumulan almidón. Algunas microalgas son capaces de transformar este almidón en productos de interés como láctico, etanol, acético o fórmico en ausencia de luz [59].

En cuanto a los microorganismos empleados para la producción del isómero D- del ácido láctico, existen algunas especies capaces de producir este isómero de forma natural. Para que la cepa sea considerada como productora de ácido D-láctico, y este pueda tener una aplicación en el mercado, la pureza debe ser superior al 90 % [74]. En la literatura actual se pueden encontrar algunas cepas silvestres o *wild type* capaces de producir ácido láctico con una pureza superior al 90 % del isómero D-, a partir de distintas fuentes renovables. Entre estas podemos encontrar diferentes especies del género *Sporolactobacillus* como *S. inulinus* o *S. laevolacticus*, que son capaces obtener

altos rendimientos a partir de residuos de maíz o de semillas de la planta de algodón [75-77]. También el género *Lactobacillus* tiene productores de ácido D-láctico como *L. coryniformis*, que se emplea en literatura para producir el isómero D- a partir de residuos de patata o pastas de celulosa en SSF o SHF [78]; o *Lactobacillus delbrueckii*, una de las especies más utilizadas para producir este isómero. Dentro de esta especie se encuentra *L. delbrueckii* ssp. *delbrueckii*, que es capaz de producir a partir de rastrojos de maíz, residuos de arroz, residuos de caña de azúcar o residuos de remolacha; *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *L. delbrueckii* ssp. *lactis* también se han empleado para producir el isómero D- a partir de sustratos como el suero de la leche [79-83].

Por otro lado, la literatura también recoge cepas que tras aplicar técnicas de ingeniería genética son capaces de producir ácido D-láctico. Generalmente se suelen emplear cepas que rindan buenos resultados en la producción de ácido L-láctico. Es decir, se emplean microorganismos capaces de producir altas concentraciones del isómero L- a partir de diferentes residuos. Para ello lo más habitual es deleccionar o silenciar el gen responsable de la síntesis de L-lactato deshidrogenasa (L-LDH) o bien insertar el gen responsable de la síntesis de la enzima D-lactato deshidrogenasa (D-LDH) [84]. Este tipo de modificaciones se han encontrado en *Escherichia coli* [85] o especies del género *Bacillus* [86], pero, generalmente, se suelen emplear especies de *Lactobacillus* como *L. plantarum* [87-91] o *L. lactis* [92].

4.2. Factores que afectan a la producción biotecnológica

Existen múltiples factores que afectan a la producción de ácido láctico como las condiciones de operación o la composición del medio de cultivo. Entre las condiciones de operación, la temperatura óptima para producir ácido láctico se encuentra entre 37 °C y 45 °C. En el caso del pH, este tendrá un mayor efecto que la temperatura sobre los rendimientos finales de ácido láctico, ya que durante la producción de ácido láctico el pH baja muy rápido a causa de un incremento en la concentración del producto, lo que suele afectar a la viabilidad del microorganismo y, en consecuencia, a la productividad y a los rendimientos finales [73, 93]. El pH óptimo para llevar a cabo el proceso está entre valores de 5 a 7, por lo que algunas investigaciones se han centrado en estudiar el tipo de agente neutralizante empleado para mantener esos valores [76, 81, 94-96], o bien como retirar el producto durante el proceso por electrodiálisis o

llevando a cabo el proceso con reactores de membrana que retengan el ácido láctico, evitando así la bajada tan acusada del pH [97, 98]. Es decir, desarrollar diferentes estrategias para mitigar el efecto del pH en la producción.

Por otro lado, la composición del medio de cultivo tendrá un peso determinante para llevar a cabo la producción de ácido láctico. Como se ha comentado, el ácido láctico puede ser el puente para sintetizar muchos compuestos derivados del petróleo, pero los principales obstáculos que presentan estas aplicaciones son sus costes de producción. La mayor parte de estos costes radican en la composición del medio empleado, por lo que la elección del medio de cultivo afectará notablemente a la economía del proceso, además de los rendimientos en el producto final. En el caso de la fuente de carbono, tradicionalmente se han empleado azúcares puros o biomasa proveniente de alimentos, con los que se obtienen de manera sencilla el ácido láctico, con buenos rendimientos y bajos costes en pretratamientos y purificación. Pero estos sustratos tienen el inconveniente de que son caros en el mercado, por lo que actualmente se buscan nuevas materias primas más económicas y viables en la industria [59]. Se han considerado varios sustratos como alternativa para emplear en las biorrefinerías, como la biomasa lignocelulósica, entre otros [59, 78, 83, 99-101]. Generalmente, este tipo de residuos están constituidos por polisacáridos complejos que, al hidrolizarlos, tienen como producto principal una mezcla de hexosas y pentosas como glucosa, fructosa, galactosa, arabinosa o xilosa, entre otras. Para conseguir el máximo aprovechamiento de los residuos y el máximo rendimiento en el producto es esencial la completa utilización de estos azúcares. El inconveniente que presentan estas mezclas es que puede haber represión catabólica, o aparición de metabolismos alternativos a la glucosa que conlleva la aparición de subproductos. Es decir, en presencia de glucosa, el microorganismo puede inhibir el metabolismo de otros azúcares como xilosa o galactosa, no siendo consumido todo el sustrato y empeorando los rendimientos o bien la productividad. Además, la mayoría de las bacterias lácticas son incapaces de metabolizar pentosas, o en el caso de que lo hagan, emplean la ruta heteroláctica, donde además de ácido láctico, se producen otros subproductos que reducen los rendimientos y dificultan la purificación [59, 93, 102]. Para solventar este problema se han propuesto soluciones como el empleo de cultivos mixtos con microorganismos capaces de consumir diferentes sustratos [103, 104] o la ingeniería genética [85, 87, 88].

Por otro lado, además de la fuente de carbono, también es importante el resto de requerimientos nutricionales que completen el medio de cultivo. En el caso de trabajar con bacterias lácticas es importante remarcar que son microorganismos incapaces de sintetizar algunos elementos necesarios para su propio crecimiento [93]. Por lo que estos microorganismos necesitan altas concentraciones de fuente de nitrógeno, vitaminas principalmente de tipo B y nucleótidos que repercutirán sobre el crecimiento celular y la producción de ácido láctico [81, 101, 105, 106]. Medios de cultivo tan complejos suelen ser caros e incrementan los costes en la purificación del producto. Debido a esto, muchos estudios se han centrado en estudiar el efecto de la fuente de nitrógeno u otros requerimientos nutricionales y como reducirlo para intentar hacer económicamente viable el proceso de producción de ácido láctico [82, 86, 88, 105, 107-109].

4.3. Formas de operación

Para llevar a cabo la producción de ácido láctico a partir de biomasa renovable se han descrito diferentes formas de operar, atendiendo al tipo de operación, estado de las células, o el orden de las diferentes etapas de todo el proceso. Atendiendo al tipo de operación, la forma más clásica para trabajar es en discontinuo o *batch*, ya que es una operación simple donde se obtienen altas concentraciones de producto, pero puede aparecer inhibición por sustrato y/o producto [59]. Para solucionar los problemas de inhibición por sustrato, se puede operar en *fed-batch*, donde también se obtienen altas concentraciones de producto lo que puede originar una fuerte inhibición [59, 75, 76, 110-112]. Otra opción sería llevar a cabo sucesivos procesos *batch* (conocido como *repeated batch*), donde se llevan a cabo varios ciclos de producción que se inoculan con parte de las células del cultivo anterior, o bien se pueden emplear todas las células. Las ventajas que ofrece serían el ahorro de trabajo en preparar el microorganismo y ahorro de tiempo porque los microorganismos presentan una alta velocidad de crecimiento, y el cultivo y la producción se desarrollan muy rápido. Sin embargo, este tipo de operación requiere dispositivos especiales [59, 76, 112-114]. Por último, operar en continuo, también puede ser una opción ya que evita la inhibición por sustrato y producto, además que se obtienen altas productividades; sin embargo, hay una utilización incompleta de la fuente de carbono [115].

Por otro lado, este tipo de proceso se suele llevar a cabo separando las etapas de hidrólisis y fermentación (*Separated Hydrolysis and Fermentation*, SHF), pero también se ha estudiado el proceso en una etapa. En esta única etapa se llevaría a cabo la hidrólisis y la fermentación a la vez (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*, SSF), por lo que solo se necesitaría un reactor y se evitaría la inhibición por producto, en el caso de la hidrólisis, y la inhibición por sustrato en la fermentación, además de que se incrementa la productividad del proceso [89, 91, 110, 116-120].

En función del estado y concentración del biocatalizador encontramos también distintas formas para llevar a cabo la producción de ácido láctico. El biocatalizador se puede emplear en crecimiento o en estado de *resting cells*, donde se limita el crecimiento del microorganismo eliminando del medio de cultivo algún componente esencial para dicho crecimiento, que suele ser la fuente de nitrógeno. Operar con células en estado de *resting cells* ofrece ventajas como abaratar los costes del medio de cultivo y de purificación [121]. En función de la concentración del catalizador, se ha desarrollado una nueva forma de operar, que aún no está muy definida y se conoce como alta densidad celular (*high cell density*, HCD). En este tipo de procesos, normalmente se suele usar una concentración de células diez veces superior a la que normalmente se emplea, y evita problemas de contaminación. Sin embargo, el diseño de la operación es complicado, ya que, normalmente, operar en HCD suele complementarse trabajando con células inmovilizadas o empleando dispositivos que permita el reciclado de estas [122, 123].

Por último, y como se comentaba anteriormente, se han diseñado procesos donde se opera con células inmovilizadas o donde se han desarrollado reactores que permiten retener las células en algún dispositivo, que a su vez esté en contacto con el medio de cultivo [59, 76, 124, 125].

Como se puede ver, atendiendo al tipo de operación, número de etapas, o estado y cantidad de biocatalizador, existe un gran número de posibilidades y combinaciones para producir ácido láctico. El objetivo principal de todas estas formas de operar es solventar los principales obstáculos que se han ido detallando en los apartados anteriores en la producción de ácido láctico a partir de materia prima renovables, además de reducir los costes diseñando un proceso económico con buenos rendimientos.

5. Retos en la revalorización de biomasa para producción de ácido D-Láctico

Anteriormente se han descrito las características más importantes de la producción de ácido láctico. Tanto las etapas de producción, sustratos empleados, medios de cultivo, formas de operación y condiciones de temperatura o pH, son iguales para producir un isómero u otro. La diferencia principal entre ambos isómeros, como se ha detallado anteriormente, es su aplicación industrial y el microorganismo a emplear para su producción. Además, como ya se ha comentado, es a partir de la última década cuando el ácido D-láctico ha ganado interés, mientras que la producción de ácido L-láctico lleva estudiándose mucho más tiempo. Aunque actualmente, la producción de ácido L-láctico está bien establecida y se lleva a cabo por vía biotecnológica, el sustrato empleado para su producción compite directamente con la disponibilidad de alimentos. Por tanto, hoy en día la producción de ácido L- o D-láctico tiene por delante el desarrollo de una producción basada en residuos que no puedan ser aprovechados por la industria alimentaria. Es decir, desarrollar una biorrefinería de segunda generación, lo que implica superar importantes retos. En la **Figura 7** se muestran los principales inconvenientes y retos que tiene por delante la producción de ácido láctico, ya sea un isómero u otro, a partir de biomasa lignocelulósica [102].

Uno de los principales retos que tiene por delante la producción biotecnológica de ácido láctico es la búsqueda de sustratos más baratos de los que se emplean actualmente (que suponen un 40-70 % de los costes totales de producción) para hacer el proceso más económico y competitivo. Como se ha comentado, se han descrito nuevas aplicaciones del ácido láctico en diversos sectores, por lo que compite directamente con la industria del petróleo para alguna de esas aplicaciones. La tecnología del petróleo, a pesar de sus inconvenientes, está mucho más desarrollada y optimizada en todos los aspectos, incluyendo el económico [102].

Como alternativa se propone el empleo de diferentes materiales, descritos en el apartado 2 de la presente Memoria (Revalorización de Biomasa lignocelulósica) para producir cualquier compuesto de alto valor añadido. Pero el empleo de este tipo de sustratos conlleva una serie de limitaciones y retos a solventar. En primer lugar, aunque se consideren residuos de un precio muy bajo, el poder emplearlos como medio fermentable requiere de un pretratamiento y una hidrólisis previa, lo que suma etapas

al proceso y lo encarece. Este tipo de materiales están constituidos por lignina, celulosa y hemicelulosa [7]. El pretratamiento es fundamental para poder retirar la lignina (fuerte inhibidor enzimático), además de romper la estructura de la celulosa y así facilitar la hidrólisis enzimática. Sin embargo, el empleo de algunos pretratamientos implica que se formen algunos compuestos que pueden inhibir tanto a las enzimas como al microorganismo. Por otro lado, en la etapa de hidrólisis se emplean diferentes celulasas y hemicelulasas que liberan los azúcares presentes como glucosa, xilosa o arabinosa a partir de celulosa y hemicelulosa. Estas enzimas suelen presentar inhibición por glucosa y celobiosa, es decir, inhibición por producto, por lo que, en ocasiones, se requieren altas concentraciones de estas enzimas, lo que supondrá un alto coste de todo el proceso [32, 43].

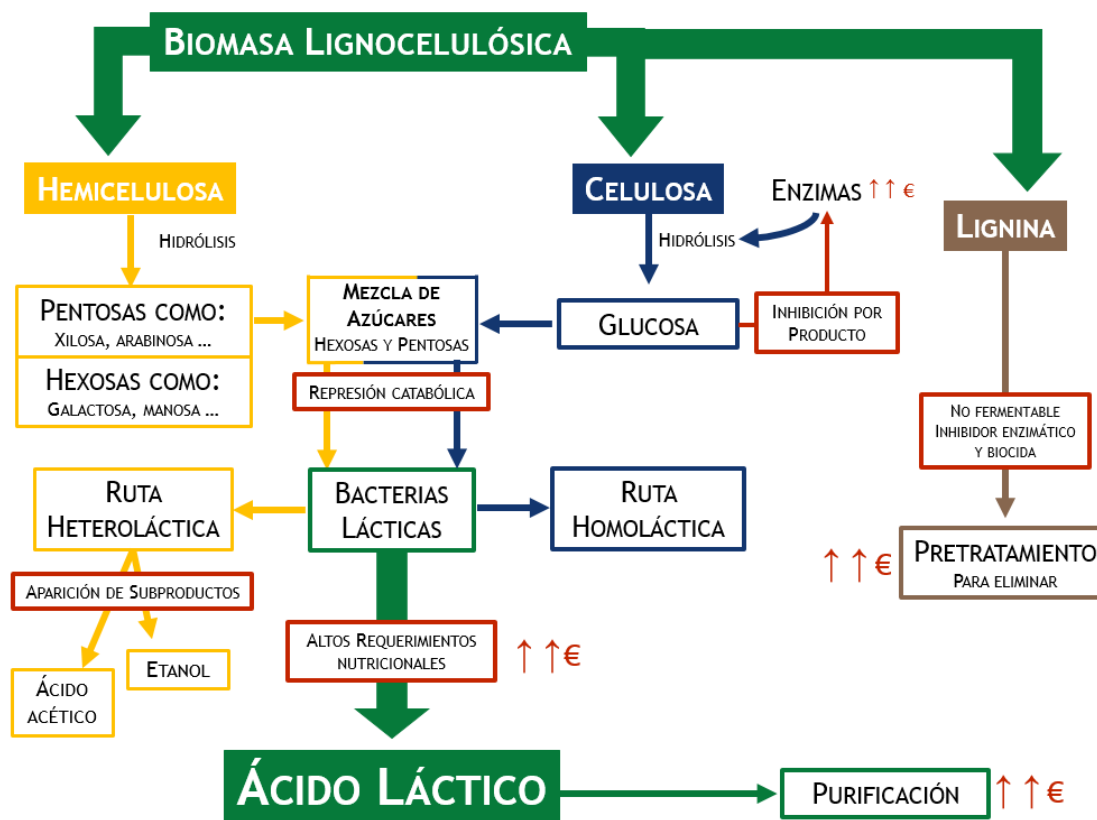


Figura 7. Principales obstáculos de la producción de ácido láctico a partir de biomasa lignocelulósica.

Por otro lado, el empleo de estos residuos, una vez pretratados e hidrolizados, dan lugar a una mezcla de azúcares compuesta por hexosas, principalmente glucosa proveniente de la celulosa, pero también galactosa o manosa que proviene de la

hemicelulosa. Por tanto, el hidrolizado de residuos lignocelulósicos contiene altas concentraciones de una mezcla de azúcares compleja, con algunos monosacáridos, y derivados de monosacáridos, poco aprovechables por los microorganismos. Por un lado, la presencia de algunos azúcares junto con glucosa origina problemas de represión catabólica [102]. Además, como se ha explicado anteriormente, las hexosas son consumidas vía homoláctica, mientras que, para metabolizar las pentosas, la ruta empleada es la heteroláctica, generando, además de ácido láctico, otros subproductos como etanol o ácido acético. Por tanto, el empleo de residuos para producir ácido láctico tiene por delante conseguir un óptimo aprovechamiento del sustrato: evitar los problemas de represión catabólica, mejorar las velocidades de consumo para azúcares que no son glucosa y conseguir transformar todos los sustratos en producto de manera que el proceso cuente con una selectividad muy alta por el ácido láctico. Para solventar este problema se han propuesto diferentes estrategias como el co-cultivo, donde se emplean más de una cepa capaz de consumir azúcares distintos [103, 104], o el empleo de técnicas de ingeniería genética [85, 126].

Por otro lado, las bacterias lácticas necesitan altas concentraciones de fuente de nitrógeno complejas que incluyan vitaminas, nucleótidos y algunos aminoácidos esenciales para su crecimiento. Se ha estudiado que el déficit de algunas vitaminas, principalmente del grupo B como riboflavina, ácido nicotínico o piridoxal, afecta directamente al crecimiento de los *Lactobacillus* y, en consecuencia, a la producción final de ácido láctico. Por otro lado, aminoácidos como arginina, ácido glutámico, histidina o valina también son esenciales para este grupo de bacterias igual que otros factores de crecimiento como purina o pirimidina [82, 106]. El problema de estos requerimientos nutricionales es que suelen ser muy caros, lo que implica incrementar los costes del proceso. Se han realizado muchos estudios para intentar determinar las concentraciones mínimas de estos compuestos necesarios para el crecimiento y producción de ácido láctico y así abaratar los costes [105, 107-109]. Otras estrategias han centrado su objetivo en buscar fuentes de nitrógeno más baratas que provengan de residuos industriales o lignocelulósicos. En este caso se han probado residuos de cacahuete, licor de maíz, residuos de soja, urea o hidrolizado de caseína [80, 116, 127].

Por último, una vez pretratada, hidrolizada y fermentada la biomasa, el último paso es la purificación del ácido láctico. Este paso también puede encarecer el proceso y, entre otros factores, depende del sustrato empleado y su composición, de los

requerimientos nutricionales añadidos al medio, de la aparición o no de subproductos y la concentración final de ácido láctico. Todo esto complica y encarece el proceso de purificación del producto, por lo que también es una etapa que continúa estudiándose para optimizarla. Como procesos llevados a cabo para purificar este ácido orgánico destaca la cromatografía de intercambio iónico, que es rápida, relativamente barata y muy selectiva, pero requiere otros pasos accesorios. También se han empleado membranas integradas capaces recuperar el producto con un menor número de operaciones y con un gasto inferior de energía. También se está estudiando la recuperación del ácido láctico mediante resinas de intercambio iónico o en solución acuosa con butanol, capaz de retener el producto [52].

6. Bibliografía

[1] M. Asif, T. Muneer, Energy supply, its demand and security issues for developed and emerging economies, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 11 (2007) 1388-1413.

[2] S. Takkellapati, T. Li, M.A. Gonzalez, An overview of biorefinery-derived platform chemicals from a cellulose and hemicellulose biorefinery, *Clean Technologies and Environmental Policy*, 20 (2018) 1615-1630.

[3] A.S. Matharu, E.M. de Melo, J.A. Houghton, Opportunity for high value-added chemicals from food supply chain wastes, *Bioresource Technology*, 215 (2016) 123-130.

[4] J. Hamilton, Historical Oil Shocks, National Bureau of Economic Research, Inc, 2011.

[5] H.R. Ghatak, Biorefineries from the perspective of sustainability: Feedstocks, products, and processes, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15 (2011) 4042-4052.

[6] N.L. Panwar, S.C. Kaushik, S. Kothari, Role of renewable energy sources in environmental protection: A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15 (2011) 1513-1524.

[7] W. Soetaert, E. Vandamme, The impact of industrial biotechnology, *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*, 1 (2006) 756-769.

- [8] S. Heux, I. Meynial-Salles, M.J. O'Donohue, C. Dumon, White biotechnology: State of the art strategies for the development of biocatalysts for biorefining, *Biotechnology Advances*, 33 (2015) 1653-1670.
- [9] L. Olsson, B.K. Ahring, *Biofuels*, Springer, Berlin, 2007.
- [10] S.-T. Yang, *Bioprocessing—from biotechnology to biorefinery, Bioprocessing for value-added products from renewable resources*, Elsevier 2007, pp. 1-24.
- [11] B. Kamm, P. R. Gruber, M. Kamm, *Biorefineries – Industrial Processes and Products*, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 2012.
- [12] J.M. Woodley, M. Breuer, D. Mink, A future perspective on the role of industrial biotechnology for chemicals production, *Chemical Engineering Research and Design*, 91 (2013) 2029-2036.
- [13] J. Tait, J. Chataway, S. Jones, The status of biotechnology-based innovation, *Technology Analysis & Strategic Management*, 2 (1990) 293-305.
- [14] M.H. Haddadi, H.T. Aiyelabegan, B. Negahdari, Advanced biotechnology in biorefinery: a new insight into municipal waste management to the production of high-value products, *International Journal of Environmental Science and Technology*, 15 (2018) 675-686.
- [15] F. Cherubini, The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals, *Energy Conversion and Management*, 51 (2010) 1412-1421.
- [16] Y.-H.P. Zhang, Next generation biorefineries will solve the food, biofuels, and environmental trilemma in the energy–food–water nexus, *Energy Science & Engineering*, 1 (2013) 27-41.
- [17] N.Q. Diep, K. Sakanishi, N. Nakagoshi, S. Fujimoto, T. Minowa, X.D. Tran, Biorefinery: concepts, current status, and development trends, *International Journal of Biomass & Renewables*, 2 (2012) 1-8.
- [18] A.S. Nizami, M. Rehan, M. Waqas, M. Naqvi, O.K.M. Ouda, K. Shahzad, R. Miandad, M.Z. Khan, M. Syamsiro, I.M.I. Ismail, D. Pant, Waste biorefineries:

Enabling circular economies in developing countries, *Bioresource Technology*, 241 (2017) 1101-1117.

[19] G. Fiorentino, M. Ripa, S. Ulgiati, Chemicals from biomass: technological versus environmental feasibility. A review, *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 11 (2017) 195-214.

[20] J.S. Van Dyk, B.I. Pletschke, A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—Factors affecting enzymes, conversion and synergy, *Biotechnology Advances*, 30 (2012) 1458-1480.

[21] F.H. Isikgor, C.R. Becer, Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers, *Polymer Chemistry*, 6 (2015) 4497-4559.

[22] FAOstat (2018) URL: <http://www.fao.org/faostat/en/#home>. Consultada el 22/1/2019.

[23] K. Rezzadori, S. Benedetti, E. Amante, Proposals for the residues recovery: orange waste as raw material for new products, *Food and Bioproducts Processing*, 90 (2012) 606-614.

[24] M. Coma, E. Martinez-Hernandez, F. Abeln, S. Raikova, J. Donnelly, T. Arnot, M. Allen, D.D. Hong, C.J. Chuck, Organic waste as a sustainable feedstock for platform chemicals, *Faraday discussions*, 202 (2017) 175-195.

[25] X. Zhao, L. Zhang, D. Liu, Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose, *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 6 (2012) 465-482.

[26] A. Limayem, S.C. Ricke, Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects, *Progress in Energy and Combustion Science*, 38 (2012) 449-467.

[27] D.P. Maurya, A. Singla, S. Negi, An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol, *3 Biotech*, 5 (2015) 597-609.

[28] J.S. Van Dyk, R. Gama, D. Morrison, S. Swart, B.I. Pletschke, Food processing waste: Problems, current management and prospects for utilisation of the lignocellulose component through enzyme synergistic degradation, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 26 (2013) 521-531.

[29] F. Talebnia, D. Karakashev, I. Angelidaki, Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation, *Bioresource Technology*, 101 (2010) 4744-4753.

[30] M. FitzPatrick, P. Champagne, M.F. Cunningham, R.A. Whitney, A biorefinery processing perspective: treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products, *Bioresource Technology*, 101 (2010) 8915-8922.

[31] P. Alvira, E. Tomás-Pejó, M. Ballesteros, M.J. Negro, Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review, *Bioresource Technology*, 101 (2010) 4851-4861.

[32] V. Arantes, J.N. Saddler, Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates, *Biotechnology for Biofuels*, 4 (2011) 3.

[33] S. Sun, S. Sun, X. Cao, R. Sun, The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials, *Bioresource Technology*, 199 (2016) 49-58.

[34] V.K. Gupta, C.P. Kubicek, J.-G. Berrin, D.W. Wilson, M. Couturier, A. Berlin, E.X.F. Filho, T. Ezeji, Fungal Enzymes for Bio-Products from Sustainable and Waste Biomass, *Trends in Biochemical Sciences*, 41 (2016) 633-645.

[35] A.V. Lisov, O.V. Belova, Z.A. Lisova, N.G. Vinokurova, A.S. Nagel, Z.I. Andreeva-Kovalevskaya, Z.I. Budarina, M.O. Nagornykh, M.V. Zakharova, A.M. Shadrin, A.S. Solonin, A.A. Leontievsky, Xylanases of *Cellulomonas flavigena*: expression, biochemical characterization, and biotechnological potential, *AMB Express*, 7 (2017) 5.

[36] H. Bai, M. Irfan, Y. Wang, H. Wang, X. Han, Purification and characterization of cellulose degrading enzyme from newly isolated *Cellulomonas* sp., *Cellulose Chemistry and Technology*, 51 (2017) 283-290.

[37] S. Ellilä, L. Fonseca, C. Uchima, J. Cota, G.H. Goldman, M. Saloheimo, V. Sacon, M. Siika-aho, Development of a low-cost cellulase production process using *Trichoderma reesei* for Brazilian biorefineries, *Biotechnology for Biofuels*, 10 (2017) 30.

[38] N. Lopez-Ramirez, T. Volke-Sepulveda, I. Gaime-Perraud, G. Saucedo-Castañeda, E. Favela-Torres, Effect of stirring on growth and cellulolytic enzymes production by *Trichoderma harzianum* in a novel bench-scale solid-state fermentation bioreactor, *Bioresource Technology*, 265 (2018) 291-298.

[39] Hemansi, R. Gupta, R.C. Kuhad, J.K. Saini, Cost effective production of complete cellulase system by newly isolated *Aspergillus niger* RCKH-3 for efficient enzymatic saccharification: Medium engineering by overall evaluation criteria approach (OEC), *Biochemical Engineering Journal*, 132 (2018) 182-190.

[40] P. Tallapragada, K. Venkatesh, Isolation, identification and optimization of xylanase enzyme produced by *Aspergillus niger* under submerged fermentation, *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 1 (2017) 137-147.

[41] F. Zhang, X. Zhao, F. Bai, Improvement of cellulase production in *Trichoderma reesei* Rut-C30 by overexpression of a novel regulatory gene Trvib-1, *Bioresource Technology*, 247 (2018) 676-683.

[42] Q.-S. Meng, C.-G. Liu, X.-Q. Zhao, F.-W. Bai, Engineering *Trichoderma reesei* Rut-C30 with the overexpression of *egl1* at the *ace1* locus to relieve repression on cellulase production and to adjust the ratio of cellulolytic enzymes for more efficient hydrolysis of lignocellulosic biomass, *Journal of biotechnology*, 285 (2018) 56-63.

[43] Y. Sun, J. Cheng, Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review, *Bioresource technology*, 83 (2002) 1-11.

[44] C.S. Farinas, M.M. Loyo, A. Baraldo, P.W. Tardioli, V.B. Neto, S. Couri, Finding stable cellulase and xylanase: evaluation of the synergistic effect of pH and temperature, *New Biotechnology*, 27 (2010) 810-815.

[45] O. Rosales-Calderon, H.L. Trajano, S.J. Duff, Stability of commercial glucanase and β -glucosidase preparations under hydrolysis conditions, *PeerJ*, 2 (2014) e402.

- [46] T.Q. Lan, H. Lou, J.Y. Zhu, Enzymatic saccharification of lignocelluloses should be conducted at elevated pH 5.2–6.2, *BioEnergy Research*, 6 (2013) 476-485.
- [47] M. Cui, Y. Zhang, R. Huang, R. Su, W. Qi, Z. He, Enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulose by integrated decrystallization and fed-batch operation, *RSC Advances*, 4 (2014) 44659-44665.
- [48] Y.E.C. Sugiharto, A. Harimawan, M.T.A.P. Kresnowati, R. Purwadi, R. Mariyana, H.N. Fitriana, H.F. Hosen, Enzyme feeding strategies for better fed-batch enzymatic hydrolysis of empty fruit bunch, *Bioresource Technology*, 207 (2016) 175-179.
- [49] P. Pocan, E. Bahcegul, M.H. Oztop, H. Hamamci, Enzymatic hydrolysis of fruit peels and other lignocellulosic biomass as a source of sugar, *Waste and Biomass Valorization*, 9 (2018) 929-937.
- [50] J.-W. Lee, R.C. Rodrigues, T.W. Jeffries, Simultaneous saccharification and ethanol fermentation of oxalic acid pretreated corncob assessed with response surface methodology, *Bioresource Technology*, 100 (2009) 6307-6311.
- [51] M.R. Wilkins, W.W. Widmer, K. Grohmann, Simultaneous saccharification and fermentation of citrus peel waste by *Saccharomyces cerevisiae* to produce ethanol, *Process Biochemistry*, 42 (2007) 1614-1619.
- [52] T. Ghaffar, M. Irshad, Z. Anwar, T. Aqil, Z. Zulifqar, A. Tariq, M. Kamran, N. Ehsan, S. Mehmood, Recent trends in lactic acid biotechnology: a brief review on production to purification, *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 7 (2014) 222-229.
- [53] F.A.C. Martinez, E.M. Balciunas, J.M. Salgado, J.M.D. González, A. Converti, R.P. de Souza Oliveira, Lactic acid properties, applications and production: a review, *Trends in Food Science & Technology*, 30 (2013) 70-83.
- [54] Y. Fan, C. Zhou, X. Zhu, Selective catalysis of lactic acid to produce commodity chemicals, *Catalysis Reviews*, 51 (2009) 293-324.
- [55] A. Södergård, M. Stolt, Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition, *Progress in Polymer Science*, 27 (2002) 1123-1163.

[56] M. Singhvi, T. Zendo, K. Sonomoto, Free lactic acid production under acidic conditions by lactic acid bacteria strains: challenges and future prospects, *Applied Microbiology and Biotechnology*, (2018) 1-14.

[57] A. Komesu, J.A.R. de Oliveira, L.H. da Silva Martins, M.R.W. Maciel, R. Maciel Filho, Lactic acid production to purification: a review, *BioResources*, 12 (2017) 4364-4383.

[58] R.A. de Oliveira, A. Komesu, C.E.V. Rossell, R. Maciel Filho, Challenges and opportunities in lactic acid bioprocess design—From economic to production aspects, *Biochemical Engineering Journal*, (2018).

[59] M.A. Abdel-Rahman, Y. Tashiro, K. Sonomoto, Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes, *Biotechnology Advances*, 31 (2013) 877-902.

[60] M.A. Abdel-Rahman, Y. Tashiro, K. Sonomoto, Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: overview and limits, *Journal of Biotechnology*, 156 (2011) 286-301.

[61] J. Vijayakumar, R. Aravindan, T. Viruthagiri, Recent trends in the production, purification and application of lactic acid, *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 22 (2008) 245-264.

[62] Y.-J. Wee, J.-N. Kim, H.-W. Ryu, Biotechnological production of lactic acid and its recent applications, *Food Technology and Biotechnology*, 44 (2006) 163-172.

[63] M.J. Bidy, C. Scarlata, C. Kinchin, Chemicals from biomass: a market assessment of bioproducts with near-term potential, *NREL Report*, (2016).

[64] A.J. Lasprilla, G.A. Martinez, B.H. Lunelli, A.L. Jardini, R. Maciel Filho, Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices—A review, *Biotechnology Advances*, 30 (2012) 321-328.

[65] M. Jamshidian, E.A. Tehrany, M. Imran, M. Jacquot, S. Desobry, Poly-Lactic Acid: Production, Applications, Nanocomposites, and Release Studies, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9 (2010) 552-571.

- [66] L. Avérous, Polylactic acid: synthesis, properties and applications, Monomers, polymers and composites from renewable resources, Elsevier 2008, pp. 433-450.
- [67] L. Shen, E. Worrell, M. Patel, Present and future development in plastics from biomass, Biofuels, Bioproducts and Biorefining: Innovation for a sustainable economy, 4 (2010) 25-40.
- [68] K.M. Nampoothiri, N.R. Nair, R.P. John, An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research, Bioresource Technology, 101 (2010) 8493-8501.
- [69] L.T. Lim, R. Auras, M. Rubino, Processing technologies for poly(lactic acid), Progress in Polymer Science, 33 (2008) 820-852.
- [70] H. Tsuji, Poly (lactide) stereocomplexes: formation, structure, properties, degradation, and applications, Macromolecular Bioscience, 5 (2005) 569-597.
- [71] R.M. Rasal, A.V. Janorkar, D.E. Hirt, Poly (lactic acid) modifications, Progress in Polymer Science, 35 (2010) 338-356.
- [72] P. Saini, M. Arora, M.N.V.R. Kumar, Poly(lactic acid) blends in biomedical applications, Advanced Drug Delivery Reviews, 107 (2016) 47-59.
- [73] K. Hofvendahl, B. Hahn-Hägerdal, Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources¹, Enzyme and Microbial Technology, 26 (2000) 87-107.
- [74] K. Okano, T. Tanaka, C. Ogino, H. Fukuda, A. Kondo, Biotechnological production of enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: recent achievements, perspectives, and limits, Applied Microbiology and Biotechnology, 85 (2010) 413-423.
- [75] Y. Li, L. Wang, J. Ju, B. Yu, Y. Ma, Efficient production of polymer-grade d-lactate by *Sporolactobacillus laevolacticus* DSM442 with agricultural waste cottonseed as the sole nitrogen source, Bioresource Technology, 142 (2013) 186-191.
- [76] T. Zhao, D. Liu, H. Ren, X. Shi, N. Zhao, Y. Chen, H. Ying, D-Lactic acid production by *Sporolactobacillus inulinus* Y2-8 immobilized in fibrous bed bioreactor

using corn flour hydrolyzate, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24 (2014) 1664-1672.

[77] Z. Bai, Z. Gao, J. Sun, B. Wu, B. He, D-Lactic acid production by *Sporolactobacillus inulinus* YBS1-5 with simultaneous utilization of cottonseed meal and corncob residue, *Bioresource Technology*, 207 (2016) 346-352.

[78] A. de Oliveira Moraes, N.I.B. Ramirez, N. Pereira, Evaluation of the fermentation potential of pulp mill residue to produce d(-)-Lactic acid by separate hydrolysis and fermentation using *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 180 (2016) 1574-1585.

[79] Y. Zhang, P.V. Vadlani, D-Lactic acid biosynthesis from biomass-derived sugars via *Lactobacillus delbrueckii* fermentation, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36 (2013) 1897-1904.

[80] S. Prasad, K. Srikanth, A.M. Limaye, S. Sivaprakasam, Homo-fermentative production of D-lactic acid by *Lactobacillus* sp. employing casein whey permeate as a raw feed-stock, *Biotechnology Letters*, 36 (2014) 1303-1307.

[81] S. Nakano, C.U. Ugwu, Y. Tokiwa, Efficient production of d(-)-lactic acid from broken rice by *Lactobacillus delbrueckii* using $\text{Ca}(\text{OH})_2$ as a neutralizing agent, *Bioresource Technology*, 104 (2012) 791-794.

[82] Z. Lu, M. Lu, F. He, L. Yu, An economical approach for D-lactic acid production utilizing unpolished rice from aging paddy as major nutrient source, *Bioresource Technology*, 100 (2009) 2026-2031.

[83] B.P. Calabria, Y. Tokiwa, Production of D-lactic acid from sugarcane molasses, sugarcane juice and sugar beet juice by *Lactobacillus delbrueckii*, *Biotechnology Letters*, 29 (2007) 1329-1332.

[84] S. Klotz, N. Kaufmann, A. Kuenz, U. Prüße, Biotechnological production of enantiomerically pure D-lactic acid, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100 (2016) 9423-9437.

[85] H. Lu, X. Zhao, Y. Wang, X. Ding, J. Wang, E. Garza, R. Manow, A. Iverson, S. Zhou, Enhancement of D-lactic acid production from a mixed glucose and

xylose substrate by the *Escherichia coli* strain JH15 devoid of the glucose effect, BMC Biotechnology, 16 (2016) 19.

[86] N. Assavasirijinda, D. Ge, B. Yu, Y. Xue, Y. Ma, Efficient fermentative production of polymer-grade d-lactate by an engineered alkaliphilic *Bacillus* sp. strain under non-sterile conditions, Microbial Cell Factories, 15 (2016) 3.

[87] S. Yoshida, K. Okano, T. Tanaka, C. Ogino, A. Kondo, Homo-D-lactic acid production from mixed sugars using xylose-assimilating operon-integrated *Lactobacillus plantarum*, Applied Microbiology and Biotechnology, 92 (2011) 67.

[88] Y. Zhang, P.V. Vadlani, A. Kumar, P.R. Hardwidge, R. Govind, T. Tanaka, A. Kondo, Enhanced D-lactic acid production from renewable resources using engineered *Lactobacillus plantarum*, Applied Microbiology and Biotechnology, 100 (2016) 279-288.

[88] S. Hama, S. Mizuno, M. Kihara, T. Tanaka, C. Ogino, H. Noda, A. Kondo, Production of D-lactic acid from hardwood pulp by mechanical milling followed by simultaneous saccharification and fermentation using metabolically engineered *Lactobacillus plantarum*, Bioresource Technology, 187 (2015) 167-172.

[90] Y. Zhang, A. Kumar, P.R. Hardwidge, T. Tanaka, A. Kondo, P.V. Vadlani, D-lactic acid production from renewable lignocellulosic biomass via genetically modified *Lactobacillus plantarum*, Biotechnology Progress, 32 (2016) 271-278.

[91] K. Okano, S. Hama, M. Kihara, H. Noda, T. Tanaka, A. Kondo, Production of optically pure D-lactic acid from brown rice using metabolically engineered *Lactobacillus plantarum*, Applied Microbiology and Biotechnology, 101 (2017) 1869-1875.

[92] D.S. Joshi, M.S. Singhvi, J.M. Khire, D.V. Gokhale, Strain improvement of *Lactobacillus lactis* for D-lactic acid production, Biotechnology Letters, 32 (2010) 517-520.

[93] Y. Wang, Y. Tashiro, K. Sonomoto, Fermentative production of lactic acid from renewable materials: recent achievements, prospects, and limits, Journal of Bioscience and Bioengineering, 119 (2015) 10-18.

[94] Y. Liu, W. Gao, X. Zhao, J. Wang, E. Garza, R. Manow, S. Zhou, Pilot scale demonstration of D-lactic acid fermentation facilitated by $\text{Ca}(\text{OH})_2$ using a metabolically engineered *Escherichia coli*, *Bioresource Technology*, 169 (2014) 559-565.

[95] K. Hetényi, Á. Németh, B. Sevela, Role of pH-regulation in lactic acid fermentation: Second steps in a process improvement, *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 50 (2011) 293-299.

[96] J. Qin, X. Wang, Z. Zheng, C. Ma, H. Tang, P. Xu, Production of L-lactic acid by a thermophilic *Bacillus* mutant using sodium hydroxide as neutralizing agent, *Bioresource Technology*, 101 (2010) 7570-7576.

[97] M.-T. Gao, T. Shimamura, N. Ishida, H. Takahashi, pH-uncontrolled lactic acid fermentation with activated carbon as an adsorbent, *Enzyme and Microbial Technology*, 48 (2011) 526-530.

[98] P. Boontawan, S. Kanchanathawee, A. Boontawan, Extractive fermentation of l-(+)-lactic acid by *Pediococcus pentosaceus* using electrodeionization (EDI) technique, *Biochemical Engineering Journal*, 54 (2011) 192-199.

[99] M. Choi, S.M. Al-Zahrani, S.Y. Lee, Kinetic model-based feed-forward controlled fed-batch fermentation of *Lactobacillus rhamnosus* for the production of lactic acid from Arabic date juice, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37 (2014) 1007-1015.

[100] B. Gullón, R. Yáñez, J.L. Alonso, J.C. Parajó, L-Lactic acid production from apple pomace by sequential hydrolysis and fermentation, *Bioresource Technology*, 99 (2008) 308-319.

[101] T.H. Kwan, Y. Hu, C.S.K. Lin, Valorisation of food waste via fungal hydrolysis and lactic acid fermentation with *Lactobacillus casei* Shirota, *Bioresource Technology*, 217 (2016) 129-136.

[102] M.A. Abdel-Rahman, K. Sonomoto, Opportunities to overcome the current limitations and challenges for efficient microbial production of optically pure lactic acid, *Journal of Biotechnology*, 236 (2016) 176-192.

- [103] F. Cui, Y. Li, C. Wan, Lactic acid production from corn stover using mixed cultures of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus brevis*, *Bioresource Technology*, 102 (2011) 1831-1836.
- [104] Y. Zhang, P.V. Vadlani, Lactic acid production from biomass-derived sugars via co-fermentation of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus plantarum*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119 (2015) 694-699.
- [105] A. Nancib, N. Nancib, D. Meziane-Cherif, A. Boubendir, M. Fick, J. Boudrant, Joint effect of nitrogen sources and B vitamin supplementation of date juice on lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*, *Bioresource Technology*, 96 (2005) 63-67.
- [106] E.M. Hebert, R.R. Raya, G.S. De Giori, Nutritional requirements and nitrogen-dependent regulation of proteinase activity of *Lactobacillus helveticus* CRL 1062, *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (2000) 5316-5321.
- [107] M. Singhvi, A. Jadhav, D. Gokhale, Supplementation of medium with diammonium hydrogen phosphate enhanced the d-lactate dehydrogenase levels leading to increased D-lactic acid productivity, *Bioresource Technology*, 146 (2013) 736-739.
- [108] C.M. Nguyen, G.J. Choi, Y.H. Choi, K.S. Jang, J.-C. Kim, D- and L-lactic acid production from fresh sweet potato through simultaneous saccharification and fermentation, *Biochemical Engineering Journal*, 81 (2013) 40-46.
- [109] I.-K. Yoo, H.N. Chang, E.G. Lee, Y.K. Chang, S.-H. Moon, Effect of B vitamin supplementation on lactic acid production by *Lactobacillus casei*, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84 (1997) 172-175.
- [110] A. Romani, R. Yáñez, G. Garrote, J.L. Alonso, SSF production of lactic acid from cellulosic biosludges, *Bioresource Technology*, 99 (2008) 4247-4254.
- [111] M.A. Abdel-Rahman, Y. Xiao, Y. Tashiro, Y. Wang, T. Zendo, K. Sakai, K. Sonomoto, Fed-batch fermentation for enhanced lactic acid production from glucose/xylose mixture without carbon catabolite repression, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119 (2015) 153-158.

[112] S. Tosungnoen, K. Chookietwattana, S. Dararat, Lactic acid production from repeated-batch and simultaneous saccharification and fermentation of cassava starch wastewater by amylolytic *Lactobacillus plantarum* MSUL 702, APCBEE Procedia, 8 (2014) 204-209.

[113] B. Zhao, L. Wang, F. Li, D. Hua, C. Ma, Y. Ma, P. Xu, Kinetics of D-lactic acid production by *Sporolactobacillus* sp. strain CASD using repeated batch fermentation, Bioresource Technology, 101 (2010) 6499-6505.

[114] H. Oh, Y.-J. Wee, J.-S. Yun, H.-W. Ryu, Lactic acid production through cell-recycle repeated-batch bioreactor, Applied Biochemistry and Biotechnology, 107 (2003) 603-613.

[115] Y. Tashiro, W. Kaneko, Y. Sun, K. Shibata, K. Inokuma, T. Zendo, K. Sonomoto, Continuous D-lactic acid production by a novel thermotolerant *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* QU 41, Applied Microbiology and Biotechnology, 89 (2011) 1741-1750.

[116] L. Wang, B. Zhao, F. Li, K. Xu, C. Ma, F. Tao, Q. Li, P. Xu, Highly efficient production of d-lactate by *Sporolactobacillus* sp. CASD with simultaneous enzymatic hydrolysis of peanut meal, Applied Microbiology and Biotechnology, 89 (2011) 1009-1017.

[117] J. Hu, Z. Zhang, Y. Lin, S. Zhao, Y. Mei, Y. Liang, N. Peng, High-titer lactic acid production from NaOH-pretreated corn stover by *Bacillus coagulans* LA204 using fed-batch simultaneous saccharification and fermentation under non-sterile condition, Bioresource Technology, 182 (2015) 251-257.

[118] L. Zhang, X. Li, Q. Yong, S.-T. Yang, J. Ouyang, S. Yu, Simultaneous saccharification and fermentation of xylo-oligosaccharides manufacturing waste residue for L-lactic acid production by *Rhizopus oryzae*, Biochemical Engineering Journal, 94 (2015) 92-99.

[119] S. Marques, F.M. Gírio, J.A.L. Santos, J.C. Roseiro, Pulsed fed-batch strategy towards intensified process for lactic acid production using recycled paper sludge, Biomass Conversion and Biorefinery, 7 (2017) 127-137.

[120] S. Shi, J. Li, D.M. Blersch, Utilization of solid catfish manure waste as carbon and nutrient source for lactic acid production, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102 (2018) 4765-4772.

[121] Y. Tsuge, H. Kawaguchi, K. Sasaki, T. Tanaka, A. Kondo, Two-step production of d-lactate from mixed sugars by growing and resting cells of metabolically engineered *Lactobacillus plantarum*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98 (2014) 4911-4918.

[122] U. Kulozik, J. Wilde, Rapid lactic acid production at high cell concentrations in whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus*, *Enzyme and Microbial Technology*, 24 (1999) 297-302.

[123] Y. Wang, H. Meng, D. Cai, B. Wang, P. Qin, Z. Wang, T. Tan, Improvement of L-lactic acid productivity from sweet sorghum juice by repeated batch fermentation coupled with membrane separation, *Bioresource Technology*, 211 (2016) 291-297.

[124] A. Idris, W. Suzana, Effect of sodium alginate concentration, bead diameter, initial pH and temperature on lactic acid production from pineapple waste using immobilized *Lactobacillus delbrueckii*, *Process Biochemistry*, 41 (2006) 1117-1123.

[125] M. Rosenberg, M. Rebroš, L. Krištofiková, K. Malátová, High temperature lactic acid production by *Bacillus coagulans* immobilized in lentiKats, *Biotechnology Letters*, 27 (2005) 1943-1947.

[126] A. Willem Schepers, J. Thibault, C. Lacroix, *Lactobacillus helveticus* growth and lactic acid production during pH-controlled batch cultures in whey permeate/yeast extract medium. Part I. multiple factor kinetic analysis, *Enzyme and Microbial Technology*, 30 (2002) 176-186.

[127] R. Glaser, J. Venus, Model-based characterisation of growth performance and L-lactic acid production with high optical purity by thermophilic *Bacillus coagulans* in a lignin-supplemented mixed substrate medium, *New Biotechnology*, 37 (2017) 180-193.



OBJETO Y ALCANCE DEL TRABAJO

OBJETO Y ALCANCE DEL TRABAJO

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es el **estudio, desarrollo y modelización** de la **producción biotecnológica de ácido D-láctico a partir de residuos de naranja**. Para ello, se empleará la metodología establecida por el grupo de investigación “Físicoquímica de Procesos Industriales y Medioambientales” (FQPIMA-910134) del Departamento de Ingeniería Química y de Materiales de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, donde se ha llevado a cabo este trabajo. Dentro de este gran objetivo, se van a abordar una serie de sub-objetivos, que se exponen a continuación.

En primer lugar, se estudiará la etapa de **hidrólisis enzimática** de los residuos de naranja, donde la finalidad es obtener un hidrolizado con una concentración de azúcares óptima para llevar a cabo la segunda etapa de fermentación. Para ello, en primer lugar, será necesario caracterizar los residuos de naranja (procedentes de la fábrica de zumos que, la empresa García Carrión S.A., tiene en el municipio onubense de Villanueva de los Castillejos); se determinará el pretratamiento necesario a llevar a cabo (molienda y secado) para, posteriormente, estudiar la influencia de las variables en el proceso enzimático: se estudiará el efecto del pH, la temperatura, la agitación y el porcentaje de sólido empleado, en los rendimientos en glucosa y la concentración final de azúcares obtenida. Por otro lado, y debido a los costes que supone el empleo de enzimas, se estudiará tanto el efecto de su concentración, como la posibilidad de reducir el uso de las mismas, sin comprometer los rendimientos finales de la hidrólisis. Se estudiará esta etapa de hidrólisis en operación discontinua y en *fed-batch*.

La segunda etapa del proceso, la **fermentación**, tiene como finalidad la transformación de la mezcla de monosacáridos, obtenidos mediante la hidrólisis de los residuos, en ácido D-láctico empleando para ello la bacteria *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* CECT286 tanto en estado de crecimiento como de *resting cells*. Con el objetivo de maximizar tanto la concentración del ácido obtenido como la velocidad del proceso, se llevarán a cabo estudios sobre la producción del inóculo; y sobre la influencia de las condiciones de operación (temperatura y pH). Inicialmente, se empleará un medio de cultivo modelo que reproduzca la mezcla de monosacáridos obtenida de la etapa previa y se realizará un estudio detallado sobre la fuente de nitrógeno a emplear debido a su gran impacto en los costes del proceso. Finalmente,

se estudiará la posible influencia del empleo de hidrolizados reales, con diversa concentración en los monosacáridos, obtenidos en la etapa previa, al llevar a cabo la etapa de fermentación empleando células en estado de crecimiento y en estado de *resting cells*.

Por último, se llevará a cabo la **modelización cinética del proceso**, mediante la formulación de modelos cinéticos, para ambas etapas, y su ajuste a los datos experimentales obtenidos, con el objetivo de disponer de los mismos para un posible diseño de reactores. Esta modelización se abordará desde la perspectiva de la Ingeniería Química, enfocada al estudio de los fenómenos implicados en el proceso.



MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo ha sido realizado dentro del proyecto “Producción de ácidos orgánicos para síntesis de poliésteres”, enmarcado en la ERA-Net (ERA-IB) *Production of Organic Acids for Polymers*. En el presente capítulo se describe brevemente el material experimental empleado, así como los procedimientos y protocolos experimentales más relevantes para el desarrollo de la investigación que compone la presente Tesis Doctoral. En los artículos recogidos en el Anexo de este trabajo, se aporta información más detallada, tanto de los materiales como de los procedimientos experimentales.

1. Materiales

Para el desarrollo del trabajo de investigación, se han empleado diferentes reactivos recogidos en la **Tabla 3**, donde se indica la pureza, casa comercial y uso que se le ha dado a cada uno de ellos. Además de los reactivos mencionados, cabe destacar y detallar las principales características de la biomasa lignocelulósica empleada, que en este caso son residuos industriales de naranja, así como las enzimas utilizadas para su hidrólisis. Del mismo modo, también se describen las características principales del microorganismo utilizado en este estudio, *Lactobacillus delbrueckii* spp. *delbrueckii*, y la composición de los medios de cultivo empleados.

1.1. Materia prima y enzimas

La materia prima elegida para el desarrollo del trabajo son residuos industriales de naranja. Estos residuos incluyen la cáscara y la pulpa que se desechan tras la elaboración del zumo y fueron proporcionadas por el grupo empresarial J. García Carrión, S.A. Tras su recepción, fueron molidos y almacenados en el congelador para su conservación. La caracterización del residuo fue llevada a cabo por Biópolis S.L. (Valencia, España), empresa que formó parte del consorcio del proyecto en el que se enmarca esta investigación, basándose en los análisis establecidos por el Laboratorio Nacional de Energías Renovables (*National Renewable Energy Laboratory*, o NREL) de Estados Unidos [1-5]. Según los resultados obtenidos, el residuo de naranja cuenta con un 80 % de humedad, mientras que la composición del sólido se recoge en la **Tabla 4**. Las preparadas comerciales de enzimas con los que se ha trabajado para llevar a

cabo la hidrólisis de los residuos de naranjas fueron Novozyme 188, Celluclast 1.5L y Pectinex Ultra SP-L, suministradas por Novozymes S.L. En la **Tabla 5** se puede ver el tipo de actividad enzimática que presenta cada uno de los preparados comerciales.

1.2. Microorganismo

La producción de ácido D-láctico se ha llevado a cabo con la bacteria *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* CECT 286, microorganismo proporcionado por la empresa Biopolis S.L. y conservado en el laboratorio como se comentará posteriormente empleando el medio recogido en la **Tabla 6**. Para elegir el microorganismo, dentro de las tareas asignadas a Biopolis en el proyecto en el que se enmarca el presente trabajo, llevaron a cabo un *screening* entre diferentes cepas pertenecientes al género *Lactobacillus*. La selección se hizo basándose, principalmente, en el porcentaje de isómero D- del ácido láctico producido y en la capacidad de metabolizar los diferentes azúcares presentes en los residuos hidrolizados de naranja. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* CECT 286 es un microorganismo gram-positivo sin movilidad e incapaz de formar esporas. Este microorganismo, al contrario que otras cepas de su género, suele crecer en vegetales y es incapaz de fermentar la lactosa por lo que no puede crecer en la leche. Por último, pertenece al grupo de riesgo 1, por lo que no es patógeno para el ser humano [6].

Tabla 3. Listado de reactivos empleados para el desarrollo de este trabajo.

COMPUESTO	CASA COMERCIAL	PUREZA (%)	Nº CAS	Uso
Acetato de sodio	Sigma-Aldrich	99,5	6131-90-4	Formulación medio de cultivo
Acetato de triamonio	Sigma-Aldrich	>97	3458-72-8	Formulación medio de cultivo
Ácido acético	Sigma-Aldrich	99,7	64-19-7	Patrón HPLC
Ácido cítrico	Sigma-Aldrich	>99,5	77-92-9	Formulación de tampón para hidrólisis
Ácido clorhídrico	Sigma-Aldrich	37	7647-01-0	Ajuste de pH
Ácido D-láctico	Sigma-Aldrich	>90	10326-41-7	Patrón HPLC
Ácido láctico	Panreac	80	79-33-4	Patrón HPLC
Ácido sulfúrico	Sigma-Aldrich	95-98	7664-93-9	Fase móvil HPLC
Agar	Sigma-Aldrich	95	9002-18-0	Formulación medio de cultivo sólido
Alcohol isopropílico	Cor Química	70	67-63-0	Esterilización de superficies
Arabinosa	Sigma-Aldrich	98	5328-37-0	Patrón HPLC / Formulación de medio de cultivo (sustrato)
Carbonato de calcio	Sigma-Aldrich	99	471-34-1	Formulación medio de cultivo
Citrato de sodio	Sigma-Aldrich	99	6132-04-3	Formulación de tampón para hidrólisis
<i>Corn Steep Liquor</i>	Sigma-Aldrich	---	66071-94-1	Formulación medio de cultivo
Etanol	Sigma-Aldrich		64-17-5	Patrón HPLC
Extracto de carne	Sigma-Aldrich	---	68990-09-0	Formulación medio de cultivo
Extracto de levadura	Sigma-Aldrich	---	8013-01-2	Formulación medio de cultivo
Fructosa	Panreac	>99	57-48-7	Patrón HPLC / Formulación de medio de cultivo (sustrato)
Galactosa	Sigma-Aldrich	>98	59-23-4	Patrón HPLC / Formulación de medio de cultivo (sustrato)
Glicerol	Sigma-Aldrich	>99	56-81-5	Formulación medio de cultivo
Glucosa	Panreac	97,5-102	50-99-7	Patrón HPLC / Formulación de medio de cultivo (sustrato)
K ₂ HPO ₄	Panreac	>99	7758-11-4	Formulación medio de cultivo
MgSO ₄	Panreac	98	10034-99-8	Formulación medio de cultivo
MnSO ₄	Panreac	98,0-101,0	10034-96-5	Formulación medio de cultivo
NaCl	Panreac	>99	7647-14-5	Formulación medio de cultivo
NaOH	Panreac	----	1310-73-2	Ajuste de pH
Peptona	Panreac	----	91079-38-8	Formulación medio de cultivo
Sulfato de cobre	Panreac	99	7758-99-8	Fase móvil HPLC

Tabla 4. Composición del residuo de naranja seco.

COMPOSICIÓN RESIDUOS DE NARANJA	
COMPONENTE	PORCENTAJE PESO / SÓLIDO SECO
Glucosa y fructosa libre	35,2 ± 0,3
Celulosa	18,6 ± 1,9
Hemicelulosa	14,3 ± 0,2
Pectina	18,6 ± 1,9
Lignina	6,5 ± 0,6
Cenizas	3,7 ± 0,1

Tabla 5. Enzimas empleadas para llevar a cabo la hidrólisis enzimática.

NOMBRE COMERCIAL	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA
Novozyme 188	β- Glucosidasas
Celluclast 1.5 L	Endoglucanasas, Exoglucanasas
Pectinex Ultra SP-L	Pectinasas

Tabla 6. Composición del medio de conservación del microorganismo.

SOLUCIÓN CONSERVADORA	
COMPUESTO	CONCENTRACIÓN (g/L)
Glicerol	500
NaCl	4,5

1.3. Medios de cultivo

En cuanto a los medios de cultivo empleados para el desarrollo de la parte experimental, en la **Tabla 7** se recoge la composición del medio MRS (de Man, Rogosa y Sharpe), empleado para el crecimiento del microorganismo, ya que es un medio empleado para el cultivo de *Lactobacillus* en literatura. El medio MRS ha sido adquirido de la casa comercial Panreac, y empleado para el crecimiento del microorganismo en las etapas de preinóculo, inóculo y en producción. A lo largo del desarrollo del trabajo, se ha modificado la composición del medio MRS (ya que ha sido uno de los objetivos del presente trabajo), lo que se indicará en cada uno de los

casos de la experimentación. Para elaborar estas modificaciones del medio MRS, se han empleado los compuestos previamente recogidos en la **Tabla 3**.

Tabla 7. Composición del medio MRS (De Man, Rogosa y Sharpe).

MEDIO MRS (DE MAN, ROGOSA Y SHARPE)-PANREAC	
COMPUESTO	CONCENTRACIÓN (g/L)
Glucosa	20
Extracto de carne	8
Extracto de levadura	4
Peptona	10
Fosfato dipotásico	2
Acetato de Sodio · 3 H ₂ O	5
Citrato de triamonio	2
Sulfato de magnesio · 7 H ₂ O	0,2
Sulfato de manganeso · 4 H ₂ O	0,05
Tween 80	1
pH final de 6,2 ± 0,2 a 25 °C	

2. Equipos empleados

El desarrollo de la parte experimental se ha llevado a cabo con los equipos que se recogen en este apartado, agrupados en base a la función de cada uno de ellos en este trabajo. A continuación, se describen brevemente los diferentes equipos.

2.1. Sistemas de reacción

Sistema de agitador magnético con control de temperatura PID. De la casa comercial IKA[®], modelo RCT Basic y el termómetro electrónico para control de temperatura PID de la misma compañía, modelo ETS-D5. Este sistema cuenta con una placa calefactora y con agitación magnética sobre la que se coloca un baño de glicerina, en el que se introduce un matraz de fondo redondo, de 50 o 250 mL. En el interior del matraz se coloca un agitador magnético y el termómetro electrónico, con la finalidad de agitar el sistema y controlar la temperatura. Este tipo de sistema de reacción se ha empleado para llevar a cabo la hidrólisis enzimática de los residuos de naranja.

Incubadora orbital. Las incubadoras empleadas son de la casa comercial Sartorius, modelo Certomat 1S. Esta incubadora permite controlar la temperatura del interior, y mantener una agitación orbital a lo largo del tiempo. En este caso la reacción tiene lugar en botellas cerradas de 50 o 100 mL. Este sistema de reacción se ha empleado para llevar a cabo la etapa de producción de ácido D-láctico, mediante fermentación.

Biorreactor. Se ha trabajado con Biorreactores de la marca Sartorius, modelo BIOSTAT B plus. Los reactores son de tipo tanque agitado de un volumen de 1 y 2 L. Este sistema de reacción permite controlar y medir la temperatura, el pH, el oxígeno disuelto y la agitación. Para la medida y el control de la temperatura, el sistema cuenta con un sensor de temperatura Pt-100 y un controlador PID. En el caso de la agitación, la estación cuenta con un rotor conectado a las turbinas del reactor, que mantienen la agitación previamente fijada mediante un controlador PID. La medida del pH se lleva a cabo con un sensor de la marca Hamilton, mientras que el control de esta variable se lleva a cabo mediante un controlador PID que actúa sobre dos bombas peristálticas de alimentación de ácido y base. Por último, la medida del oxígeno disuelto se realiza con un sensor polarográfico de la marca Hamilton. Este sistema de reacción se ha empleado para llevar a cabo estudios a mayor escala de la etapa de fermentación.

2.2. Equipos de análisis

Espectrofotómetro. Se ha trabajado con un espectrofotómetro de absorción UV-visible de la marca Shimadzu, modelo UV-1800.

Cromatógrafo. Se ha empleado para analizar las muestras tomadas en los distintos experimentos realizados. El HPLC con el que se ha trabajado es de la marca Agilent, modelo Series1100, y cuenta con distintos módulos: soporte para eluyente o fase móvil, degasificador, bomba cuaternaria, inyector automático, horno de la columna y los módulos encargados de la detección de los distintos compuestos, detectores de diodo array y de índice de refracción. El detector de diodo array (DAD, *diode array detector*) permite obtener el espectro de absorción de los distintos componentes de la muestra (previamente separados por la columna). El detector de índice de refracción (RID, *refraction index detector*) permite cuantificar la refracción de un compuesto con respecto a una celda de referencia constituida por la fase móvil. Las columnas empleadas en este trabajo pertenecen a la casa comercial Phenomenex

y son: Rezex RCM-Monosacharide Ca^{2+} que permite la separación de los distintos monosacáridos, Rezex ROA-Organic acids H^+ empleada para separar los sustratos y productos de una fermentación y Chirex 3126 (D)-penicillamine, empleada para separar y cuantificar los dos isómeros del ácido láctico.

2.3. Equipos auxiliares

Autoclave. El autoclave con el que se ha trabajado es de la casa comercial JP Selecta, modelo II80.

Balanza de secado. La balanza de secado empleada es de la marca Kern, modelo MLB 50-3C.

Cabina de flujo. La marca de la cabina de flujo empleada es de la compañía TELSTAR, modelo Mini-V/PCR de clase 100.

Balanza de precisión. La balanza empleada para preparar los medios de cultivo, medios de reacción o soluciones patrón, entre otros, es de la marca Sartorius, modelo Practum 1102-1S.

Centrífuga. Para el desarrollo del trabajo experimental se ha utilizado la ultracentrífuga refrigerada de marca Sigma, modelo 4-16K, que cuenta con rotores tanto para botes de 250 mL, como para tubos *Eppendorf*.

Ultracongelador. EL ultracongelador empleado es de marca SANYO, modelo VIP, serie MDF-U33V.

pH-metro. Para medir el valor de pH en las soluciones que fuese necesario se ha empleado un pH-metro de la marca CRISON, modelo Basic 20.

3. Procedimientos experimentales

A continuación, se detallan los procedimientos experimentales que se han llevado a cabo para el desarrollo de este trabajo. Estos procedimientos se han dividido en pretratamiento del residuo de naranja, hidrolisis del residuo de naranja y etapa de fermentación o producción de ácido D-láctico.

3.1. Pretratamiento del residuo

Los residuos de naranja empleados para realizar los experimentos que componen esta Tesis Doctoral han sido molidos hasta un tamaño de partícula de 2 mm empleando un molino de cuchillas de uso doméstico. La molienda se ha llevado a cabo tras la recepción del residuo y, una vez molida, se almacena en un congelador a -20 °C. Para poder hidrolizarla, estos residuos molidos de naranja se ponen a temperatura ambiente el día antes a su uso.

A lo largo de este trabajo se han empleado residuos de naranja con distintos porcentajes de humedad, por lo que ha sido necesario llevar a cabo un secado parcial del residuo, en algunos casos. Para llevar a cabo este secado, se ha empleado una balanza de secado, donde se introducen entre 10 y 20 g de naranja molida. El residuo se seca a 90 °C hasta conseguir el porcentaje de humedad deseado en el residuo tratado para cada uno de los casos.

3.2. Hidrólisis enzimática del residuo

La hidrólisis enzimática de los residuos previamente molidos, se llevó a cabo en matraces de fondo redondo, cuyo volumen puede variar entre 50 y 250 mL. En estos matraces se añade el residuo de naranja y tampón citrato en una concentración de 50 mM. El matraz se coloca sobre el baño de glicerina y en el sistema de reacción descrito en el apartado anterior, que permite mantener una temperatura y agitación determinada. En la **Figura 8** se puede ver un esquema del desarrollo experimental de la hidrólisis enzimática.

Antes de dar comienzo la reacción, el pH era medido con un pH-metro externo al sistema de reacción, ajustando esta variable a un valor determinado, en el caso que fuera necesario, por adición manual de una solución de hidróxido sódico 5 M. Una vez alcanzada la temperatura, fijada la agitación y ajustado el pH, se añaden las enzimas para dar comienzo a la reacción. A lo largo del experimento, el pH fue medido y ajustado del mismo modo al descrito anteriormente.

La hidrólisis enzimática realizada según lo descrito, se ha llevado a cabo operando tanto en discontinuo (*batch*) como en semicontinuo (*fed-batch*). Para desarrollar la experimentación operando en *fed-batch*, se han añadido cargas del residuo de naranja molido (y secado, según el caso), en tiempos prefijado en el diseño

experimental. A lo largo de los experimentos se toman diferentes muestras de 1-2 mL. Estas muestras se centrifugan y filtran por un tamaño de poro de 0,2 μm , para su análisis en el HPLC.

El producto final de la reacción, en el caso de ser empleado como sustrato de la fermentación, se centrifuga y posteriormente se filtra hasta un tamaño de poro de 0,4 μm para su esterilización.

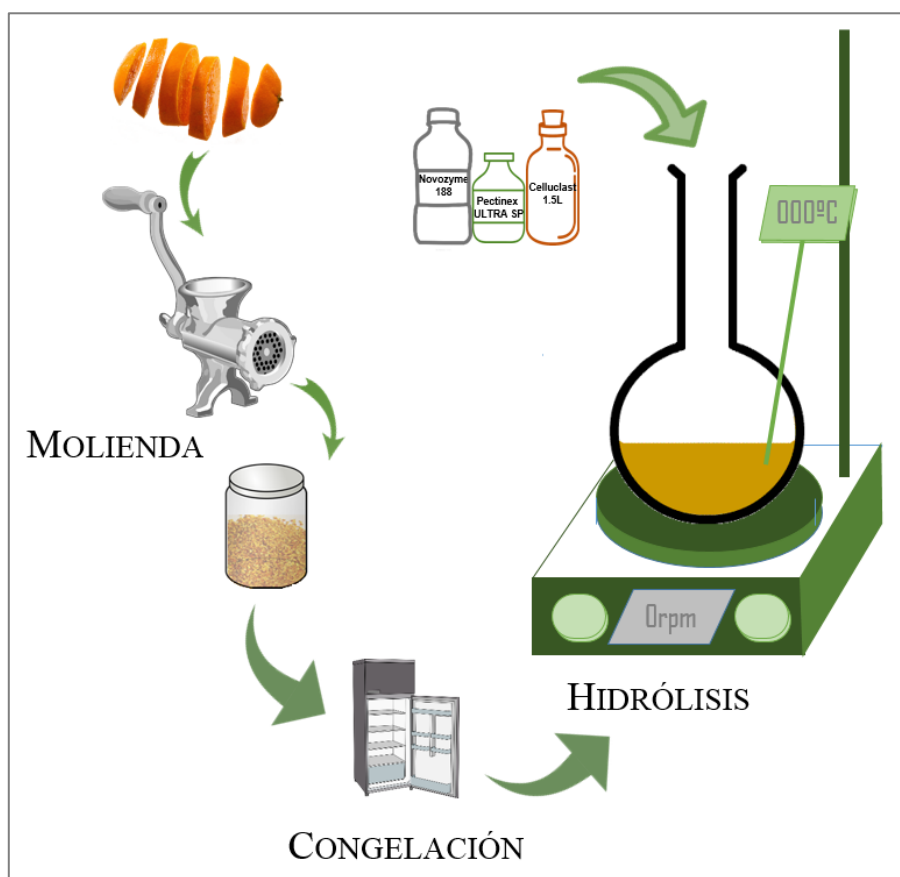


Figura 8. Esquema del procedimiento experimental para llevar a cabo el pretratamiento y la hidrólisis enzimática de residuos de naranja.

3.3. Etapa de fermentación

La metodología empleada en el desarrollo de experimentos sobre el estudio de la etapa de fermentación, se divide en Conservación del microorganismo, Preparación de las células para producción de ácido D-láctico y Producción de ácido D-láctico.

3.3.1. Conservación del microorganismo

Para conservar el microorganismo se llevó a cabo la elaboración de un *stock*, que se conservó a -80 °C. Para ello se parte de un *stock* previo o bien un cultivo en medio sólido del microorganismo, que se inocula en medio MRS líquido con la finalidad de crecer el microorganismo hasta la fase exponencial de crecimiento. Una vez que el microorganismo alcanza esta fase exponencial, el cultivo se centrifuga en botes previamente esterilizados con isopropanol. Tras la centrifugación se retira el sobrenadante y se resuspende la biomasa en un volumen conocido de la solución conservadora para obtener una concentración final de biomasa de aproximadamente 10 g/L. Este concentrado celular se reparte en diferentes viales *Eppendorf*, con un volumen de 1 mL y se almacenan a -80 °C. En la **Figura 9** se puede observar un esquema que indica el procedimiento experimental llevado a cabo para elaborar el *stock*.

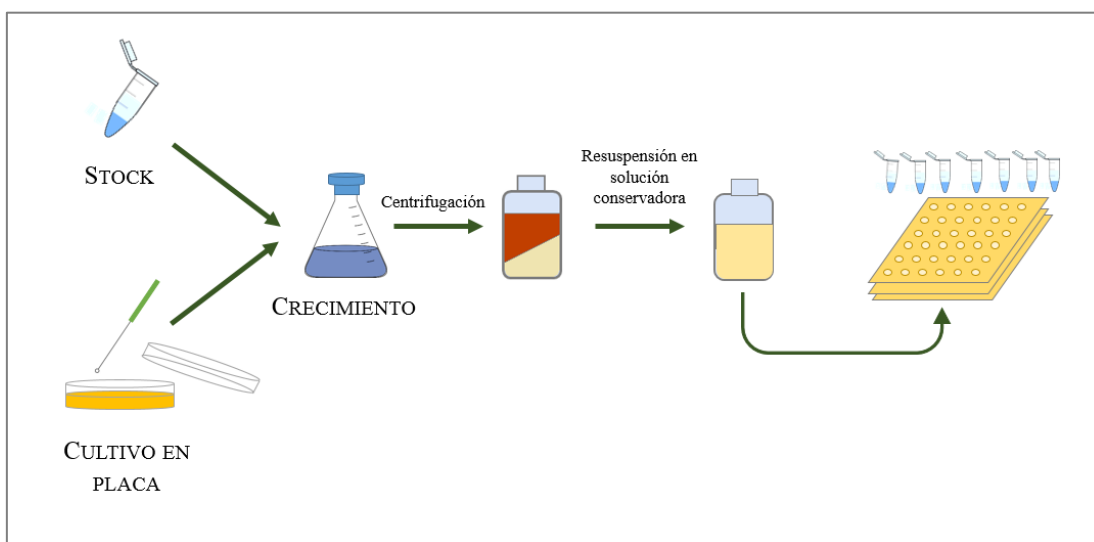


Figura 9. Esquema del procedimiento experimental para llevar a cabo el *stock* del microorganismo.

3.3.2. Preparación de las células para producción de ácido D-láctico

Partiendo del *stock* congelado, para realizar los experimentos con seguridad de que son repetitivos, se necesita preparar el microorganismo con dos etapas previas de crecimiento denominadas como preinóculo e inóculo. Ambas etapas se llevan a cabo en botellas cerradas con 50 mL de medio de cultivo, a 37 °C, 200 rpm y sin control de pH. El preinóculo se inocula en medio MRS con 1 mL del *stock*, previamente descongelado, y tiene una duración de 4 horas. Para comenzar la etapa de inóculo, se

transfieren 0,1 mL del preinóculo, de nuevo a medio MRS (o bien MRS modificando la composición, y sustituyendo la glucosa por fructosa, dependiendo del estudio realizado), dejando evolucionar el crecimiento durante 12 horas. Transcurridas estas 12 horas, el microorganismo se encuentra en la fase exponencial de crecimiento, por lo que las células serán empleadas para llevar a cabo la producción de ácido láctico.

En el presente trabajo se han realizado estudios empleando células tanto en estado de crecimiento, como de *resting cells*. En el caso de los experimentos llevados a cabo con células en crecimiento se inoculan con un 5 % (v/v) del cultivo obtenido en la segunda etapa de inóculo comentada, una vez transcurridas las 12 horas. Para los experimentos llevados a cabo con el microorganismo en estado de *resting cells*, una vez transcurridas las 12 horas de la segunda etapa de inóculo, las células se centrifugan y se resuspenden en tampón fosfato. Posteriormente se transfieren al medio de producción, que consiste, o bien en una disolución de los azúcares que se empleen como fuente de carbono en tampón fosfato, o en residuo de naranja hidrolizado. Los experimentos de producción de ácido láctico llevados a cabo con células en estado de *resting cells*, se inoculan con un 10 % (v/v).

En la **Figura 10** se puede observar un esquema de los procedimientos experimentales que se han descrito para producir ácido láctico, donde se pueden observar las etapas de preinóculo e inóculo para la preparación de la biomasa, ya sea para trabajar con células en estado de crecimiento o de *resting cells*. Estas células se han empleado para la producción de ácido D-láctico tanto a escala de botella, como de biorreactor. El procedimiento para llevar a cabo la producción se describe a continuación.

3.3.3. Producción de ácido D-láctico

En este caso hace falta distinguir entre la metodología empleada para la realización de experimentos en incubadora orbital (empleando botellas) y en biorreactor comercial.

Experimentos en botella: Los experimentos que se han llevado a cabo en incubadora orbital, tanto con células en estado crecimiento como en estado de *resting cells*, se han desarrollado con botellas cerradas de 100 mL con 50 mL del correspondiente medio de cultivo. El medio de cultivo, a excepción de la fuente de

carbono, se introduce en las botellas para ser esterilizado por calor en el autoclave, junto con 50 g/L de CaCO_3 , que permite el control de pH.

Antes de la esterilización, el oxígeno presente en la cámara de aire se desplaza mediante el empleo de una corriente de nitrógeno introducida a través de un septum, presente en el tapón de las botellas. La fuente de carbono de los medios de cultivo empleados, se autoclava por separado y se adiciona al resto del medio de cultivo en campana de flujo laminar, una vez que ambas partes del medio alcanzan una temperatura adecuada. Posteriormente, de nuevo en cámara de flujo laminar, cada una de las botellas se inocula con el volumen de inóculo preparado al efecto. Una vez inoculadas con el microorganismo, las botellas se colocan en la incubadora orbital, donde se fija la temperatura y la agitación. El pH, como se ha comentado, se mantiene en un valor superior a 5 por la presencia del carbonato cálcico en el interior de las botellas. El carbonato de calcio es insoluble, y a medida que se produce ácido láctico, este reacciona dando lugar a CO_2 y lactato de calcio.

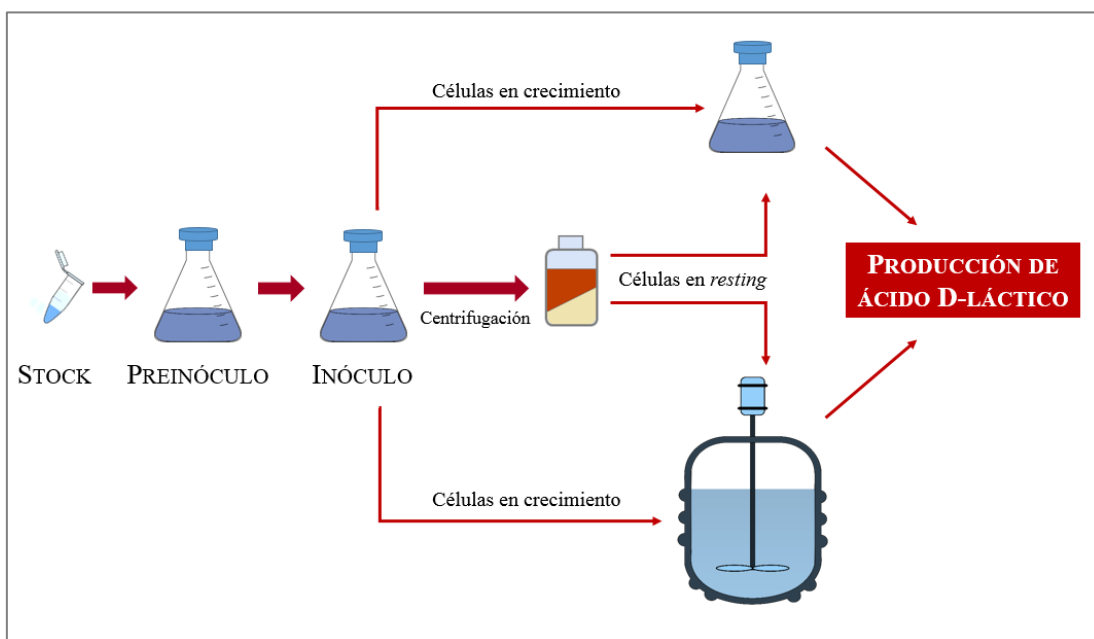


Figura 10. Esquema global de los procedimientos experimentales para llevar a cabo la fermentación de ácido D-láctico a escala de botella y de biorreactor, incluyendo la etapa de preparación de las células.

A lo largo de la duración del experimento, se toman muestras (de unos 2 mL) para llevar a cabo el seguimiento de la biomasa por espectrofotometría, de los sustratos

y productos por HPLC y la evolución del pH, lo que se mide empleando el pH metro. Una vez determinado el valor de pH, antes de ser analizadas por espectrofotometría y HPLC, estas muestras se diluyen a la mitad con una solución de HCl al 5 %, con la finalidad de hidrolizar el CaCO_3 sólido presente en el medio y evitando así interferencias en la medida de biomasa.

Experimentos en biorreactor: Los experimentos llevados a cabo en biorreactor, se han realizado en reactores de 1 y 2 L, trabajando con un volumen útil de 0,5 y 1 L, respectivamente, de medio de cultivo. El medio de cultivo se esteriliza en el interior del reactor, a excepción de la fuente de carbono, empleando un ciclo de autoclave (121 °C, 15 minutos). Como en el caso anterior, la fuente de carbono se esteriliza por separado y se adiciona una vez estéril y atemperada. Antes de inocular el reactor, el oxígeno se desorbe del medio mediante el burbujeo de nitrógeno, el cual se esteriliza por filtración antes de entrar en la vasija del reactor por un difusor de aire. Una vez retirado el oxígeno y fijadas las condiciones de operación (agitación, temperatura y pH) el reactor se inocula, para dar comienzo al experimento de producción de ácido D-láctico. El pH se controla automáticamente a lo largo del experimento por adición de NaOH 5 M o HCl 2 M.

El seguimiento del experimento se lleva a cabo por la toma de muestras a lo largo del tiempo (2 mL). Parte de esta muestra se emplea para el seguimiento de la biomasa por espectrofotometría; y otra parte de la misma se centrifuga y filtra para analizar los compuestos del medio por HPLC.

4. Métodos de análisis

4.1. Determinación de actividades enzimáticas

A continuación, se detalla el procedimiento para establecer las actividades enzimáticas, de los distintos cócteles empleados.

Novozyme 188. Esta enzima presenta actividad β -glucosidasa. Para determinar la actividad enzimática presente en este preparado enzimático, se empleó como sustrato modelo p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (pNPG), que, al ser hidrolizado por la enzima, libera p-nitrofenil. Este compuesto presenta un color amarillo a pH neutro

o básico, que permite el seguimiento de su concentración por espectrofotometría UV-Vis [7].

Celluclast 1.5L. Este cóctel enzimático presenta actividad endoglucanasa y exoglucanasa principalmente, pero también presenta una baja actividad β -glucosidasa. Para determinar la actividad celulasa de este cóctel enzimático se empleó papel de filtro nº1 Whatman, para determinar la actividad celulásica total, además de Avicel PH-101, una microcelulosa cristalina, para analizar la actividad exoglucanasa [8]. En ambos casos, se operó a 50 °C en tampón citrato 50 mM y pH 4,8, tomando muestras de la reacción durante 60 minutos. La glucosa liberada se cuantificó por HPLC de exclusión iónica, según se describe más adelante.

Pectinex Ultra SP-L. La mezcla contiene un conjunto de enzimas principalmente con actividad poligalacturonasa. La actividad enzimática se estimó de forma muy similar a la actividad celulásica solo que, en este caso, el sustrato utilizado ha sido pectina de origen cítrico (de cáscara de limón), midiéndose los moles de ácido galacturónico liberado por minuto y litro. El método de análisis es el mismo que se utiliza para cuantificar la glucosa liberada en el caso anterior [9].

4.2. Determinación de la concentración de biomasa

Para realizar el seguimiento y la cuantificación de la biomasa se empleó la espectrofotometría ultravioleta-visible; por lo que fue necesario realizar un calibrado que relacionase los valores de absorbancia a la longitud de onda predeterminada con las correspondientes concentraciones de biomasa. Para ello, partiendo de un cultivo ya crecido de la cepa, el caldo se divide en dos partes de volumen conocido. Con una parte de cultivo, se realizan diluciones para obtener diferentes concentraciones de biomasa, de las cuales se mide la absorbancia a 600 nm. Con la otra parte se determina el peso seco de biomasa presente en el cultivo inicial, conociendo así la concentración de biomasa presente en el mismo. Para ello, la biomasa fue centrifugada y lavada dos veces, para posteriormente secar el *pellet* en la estufa a 105 °C, hasta pesada constante. Con este valor de concentración total se puede determinar la concentración de biomasa presente en las diversas diluciones preparadas, enfrentando así cada concentración de biomasa con un valor de absorbancia, a partir de lo cual, se puede obtener, por regresión lineal de los datos obtenidos, la siguiente ecuación de calibrado de biomasa:

$$C_x \left(\frac{g}{L} \right) = ABS_{600\text{ nm}} \times 0,4009 \quad (\text{Eq. 1})$$

siendo C_x la concentración de biomasa y ABS el valor de absorbancia obtenido a 600 nm.

4.3. Determinación de la composición de las muestras de reacción

Para analizar las muestras recogidas, tanto de los experimentos de hidrólisis como los de fermentación se empleó la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de exclusión iónica. Como paso previo para llevar a cabo el análisis por HPLC, cada una de las muestras debe ser centrifugada para retirar cualquier partícula sólida presente en la misma. Una vez centrifugada la muestra, el sobrenadante es filtrado empleando un filtro con un tamaño de poro de 0,2 μm , siendo este líquido resultante el empleado para el análisis. A continuación, se detallan las columnas y los métodos empleados para cada uno de los compuestos analizados (independientemente de la procedencia de la muestra).

Para la identificación y cuantificación de los azúcares procedentes de hidrólisis, se ha empleado una columna Rezex RCM-*Monosaccharide* Ca^{2+} (8 %), esta columna es específica de monosacáridos. Como fase móvil se ha utilizado agua ultrapura a un caudal de 0,5 mL/min y la detección se ha realizado con el RID a una temperatura de 55 °C. La temperatura del horno, donde se encuentra la columna, se ha mantenido a 60 °C durante el análisis. Los azúcares analizados son glucosa, fructosa, galactosa y arabinosa. Las constantes de calibrado se recogen en la **Tabla 8**, junto con los tiempos de retención para cada uno de los compuestos analizados.

La columna Rezex ROA-*Organic Acids* H^+ , se ha empleado para el seguimiento y la cuantificación de diferentes sustratos y metabolitos de la fermentación, ya que es una columna específica para ácidos orgánicos. En este caso se cuantificó glucosa, fructosa, galactosa, arabinosa y ácido láctico. El método seguido fue el siguiente: un caudal de 0,5 mL/min empleando agua con H_2SO_4 al 0,005 mM como fase móvil; el horno de la columna se ha mantenido a 80 °C, mientras que el detector empleado, el RID, se ha mantenido a 55 °C. Las constantes de calibrado se recogen en la **Tabla 8**, junto con los tiempos de retención para cada uno de los compuestos analizados.

Por último, para la cuantificación de los isómeros D- y L- del ácido láctico y conocer así la pureza del producto obtenido se ha empleado una columna Chirex 3126 (D)-penicillamine, trabajando a temperatura ambiente. Como fase móvil se ha utilizado una disolución de CuSO₄ 1 mM a un caudal de 1,2 mL/min. La detección se ha llevado a cabo con el DAD a una longitud de onda de 270 nm. La cuantificación se ha realizado mediante el cálculo del porcentaje de área de cada uno de los isómeros, aplicado sobre la concentración de ácido láctico calculada con la columna anterior.

Tabla 8. Constantes de calibrado para cada uno de los compuestos analizado con las columnas empleadas.

COMPUESTO	REZEX RCM-MONOSACCHARIDE CA ²⁺ (8 %)		REZEX ROA-ORGANIC ACIDS H ⁺	
	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	CONSTANTE DE CALIBRACIÓN	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	CONSTANTE DE CALIBRACIÓN
Glucosa	13,3	0,890	3,86x10 ⁻⁶	12,4
Fructosa	17,2	0,971	3,95x10 ⁻⁶	13,3
Galactosa	15	0,869	3,93x10 ⁻⁶	13,3
Arabinosa	16,2	0,835	4,12x10 ⁻⁶	14,6
Sacarosa	11,2	0,857	-----	-----
Ácido Láctico	-----	-----	5,30x10 ⁻⁶	16,5

5. Métodos de cálculo

En la presente Memoria se aborda la modelización cinética de los datos experimentales (datos de tipo integral, Concentración vs. Tiempo). Debido a que se trata de una transformación microbiana, aunque se ha propuesto un modelo sencillo (no estructurado-no segregado), el modelo estará formado por más de una reacción y la descripción de la evolución de los componentes del sistema se deben expresar en forma de velocidades de producción de los mismos, considerando su implicación en las diferentes reacciones planteadas, según se recoge en la Ecuación 2:

$$R_j = \sum_{i=1}^{Nd} U_{ij} r_i \quad (\text{Eq. 2})$$

Debido, como se ha apuntado, a que los datos experimentales a los que se ha de ajustar el modelo son de tipo integral y el propio modelo está formado por un sistema de ecuaciones diferenciales, se hace necesaria la aplicación del método integral de cálculo, mediante la integración numérica de las ecuaciones que representan las velocidades de producción de los diversos compuestos implicados en la reacción, siendo empleado para ello el método implícito de Euler con paso variable. Para llevar a cabo el ajuste no lineal de los datos experimentales y la estimación de los parámetros cinéticos se ha empleado el algoritmo NL2SOL (*non-linear least-squares solver*), cuya función objetivo es minimizar la suma al cuadrado de los residuos. El *software* empleado, en el que se encuentran los algoritmos de cálculo comentados es el programa *Aspen Custom Modeler*[®]. Para la determinación de la fiabilidad estadística de los ajustes realizados, así como la validación del modelo cinético, se han empleado los siguientes parámetros: la suma de residuos al cuadrado, el error residual medio al cuadrado, el valor del parámetro de ajuste F de Fisher al 95 % de confianza y el porcentaje de variación explicada [10,11].

La suma de residuos al cuadrado (SRC) se define según la Ecuación 3, e indica la calidad en la reproducción de los datos experimentales a partir de los valores de los parámetros obtenidos del ajuste de los datos experimentales al modelo, donde C_j , es la concentración del compuesto j obtenido experimentalmente (exp) y calculado por el modelo (cal) y Nd el número de datos experimentales para el compuesto j.

$$SRC = \sum_{j=1}^N (C_j^{exp} - C_j^{cal})^2 \quad (\text{Eq. 3})$$

El error residual medio al cuadrado (RMSE) se calcula según la Ecuación 4, donde N es el número de datos experimentales y M el número de parámetros calculados.

$$RMSE = \sqrt{\frac{SRC}{Nd-M}} \quad (\text{Eq. 4})$$

La F de Fisher se obtiene por la Ecuación 5. Este parámetro debe ser mayor a la F-tabulada, e indica el grado de adecuación del modelo para describir los valores observados.

$$F_{Fisher} = \frac{\sum_{j=1}^{Nd} \frac{(c_j^{cal})^2}{M}}{\sum_{j=1}^{Nd} \frac{SRC}{Nd-M}} \quad (\text{Eq. 5})$$

Por último, el porcentaje de variación explicada (VE%), definido por la Ecuación 6, indica el grado de semejanza entre los valores observados y la reproducción del modelo.

$$VE (\%) = 100 \cdot \left(1 - \frac{\sum_{j=1}^{Nd} \frac{(c_j^{exp} - c_j^{cal})^2}{c_j^{cal}}}{\sum_{j=1}^{Nd} \frac{(c_j^{exp} - c_j^{exp})^2}{c_j^{cal}}} \right) \quad (\text{Eq. 6})$$

6. Bibliografía

[1] B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, A. Sluiter, J. Sluiter, D. Templeton, Preparation of samples for compositional analysis, Laboratory Analytical Procedure (LAP), 1617 (2008).

[2] A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton, Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples, National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO, (2008).

[3] A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton, D. Crocker, Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass, Laboratory Analytical Procedure (LAP), (2010).

[4] A. Sluiter, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton, Determination of extractives in biomass, Laboratory Analytical Procedure (LAP), (2008).

[5] A. Sluiter, B. Hames, D. Hyman, C. Payne, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton, J. Wolfe, Determination of total solids in biomass and total dissolved solids in liquid process samples, National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO, NREL Technical Report No. NREL/TP-510-42621, (2008) 1-6.

[6] J. E. Germond, L. Lapierre, M. Delley, B. Mollet, G. E. Felis and F. Dellaglio, Evolution of the bacterial species *Lactobacillus delbrueckii*: a partial genomic study

with reflections on prokaryotic species concept, *Molecular biology and evolution*, 20(1) (2003) 93–104.


[7] P. Kumar, B. Ryan, G. Henehan, β -Glucosidase from *Streptomyces griseus*: Nanoparticle immobilisation and application to alkyl glucoside synthesis, *Protein Expression and Purification*, 132 (2017) 164-170.

[8] D.W. Kim, Y.K. Jeong, Y.H. Jang, J.K. Lee, Purification and characterization of endoglucanase and exoglucanase components from *Trichoderma viride*, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 77 (1994) 363-369.

[9] D. Alagöz, S.S. Tükel, D. Yildirim, Immobilization of pectinase on silica-based supports: Impacts of particle size and spacer arm on the activity, *International Journal of Biological Macromolecules*, 87 (2016) 426-432.

[10] F. Garcia-Ochoa, A. Romero, V. Santos, Comparison of methods for determining the kinetic parameters in complex reactions, *International Chemical Engineering*, 32 (1992) 538-551.

[11] F. García-Ochoa, A. Romero, V. Santos, C. Rodriguez, Studies of the use of the differential method in the determination of kinetic models for complex reactions, *International Chemical Engineering*, 33 (1993).

A close-up photograph of a plant with green, elongated leaves and small white flowers. The flowers have five petals and prominent yellow stamens. Some flowers are in full bloom, while others are still buds. The background is a soft-focus green.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se ha comentado a lo largo del presente documento, en este trabajo se aborda el estudio experimental tanto de la etapa de sacarificación del residuo de naranja (mediante hidrólisis enzimática), como de la etapa de fermentación del hidrolizado para la producción de ácido D-láctico. Por otra parte, se ha llevado a cabo la modelización cinética en ambas etapas, por lo que el presente apartado se estructura en tres grandes bloques: **hidrólisis**, **fermentación** y **modelización**, comentando en cada uno de ellos los resultados obtenidos y el artículo o artículos en los que se recoge la investigación. Asimismo, cabe destacar que se ha publicado un artículo en el que se aborda una revisión bibliográfica del empleo de los residuos de naranja desde el punto de vista de su valorización mediante procesos biotecnológicos. La información contenida en este artículo no se va a incluir en el presente apartado, ya que no forma parte de los resultados.

En la **Figura 11** se muestra, de forma esquemática, el trabajo recogido en cada una de las publicaciones que conforman esta Tesis Doctoral. Estas publicaciones, que se incluyen en el Anexo, son las siguientes:

Publicación 1:

Título: *Utilization/upgrading of Orange Peel Waste from a biological biorefinery perspective.*

Autores: Isabel de la Torre, Víctor Martín, Miguel G. Acedos, Jesús Esteban, Victoria E. Santos y Miguel Ladero.

Revista: *Applied Microbiology and Biotechnology* (2019)

DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09929-2>. (on line 11 de junio 2019)

Publicación 2:

Título: *Study on the effects of several operational variables on the enzymatic batch saccharification of orange solid waste.*

Autores: Isabel de la Torre, Marianela Ravelo, Silvia Segarra, Marta Tortajada, Victoria E. Santos y Miguel Ladero.

Revista: *Bioresource Technology* 245 (2017) 906–915.

Publicación 3:

Título: *D-lactic acid production from orange waste hydrolysates with L. delbrueckii cells in growing and resting state*

Autores: Isabel de la Torre, Miguel Ladero y Victoria E. Santos

Revista: *Bioresource Technology* (enviado)

Publicación 4:

Título: *Production of D-lactic acid by L. delbrueckii growing on orange peel waste hydrolysates and model monosaccharide solutions: effects of pH and temperature on process kinetics.*

Autores: Isabel de la Torre, Miguel Ladero y Victoria E. Santos.

Revista: *Biomass Conversion and Biorefinery* (2019)

DOI: <https://doi.org/10.1007/s13399-019-00396-3>. (on line, 28 de febrero 2019)

Publicación 5:

Título: *Production of D-lactic acid by Lactobacillus delbrueckii ssp. delbrueckii from orange peel waste: techno-economical assessment of nitrogen sources.*

Autores: Isabel de la Torre, Miguel Ladero y Victoria E. Santos.

Revista: *Applied Microbiology and Biotechnology* 102 (2018) 10511-10521.

Publicación 6:

Título: *On the use of resting L. delbrueckii ssp. delbrueckii cells for D-lactic acid production from orange peel wastes hydrolysates.*

Autores: Isabel de la Torre, Miguel G. Acedos, Miguel Ladero y Victoria E. Santos.

Revista: *Biochemical Engineering Journal* 145 (2019) 162–169

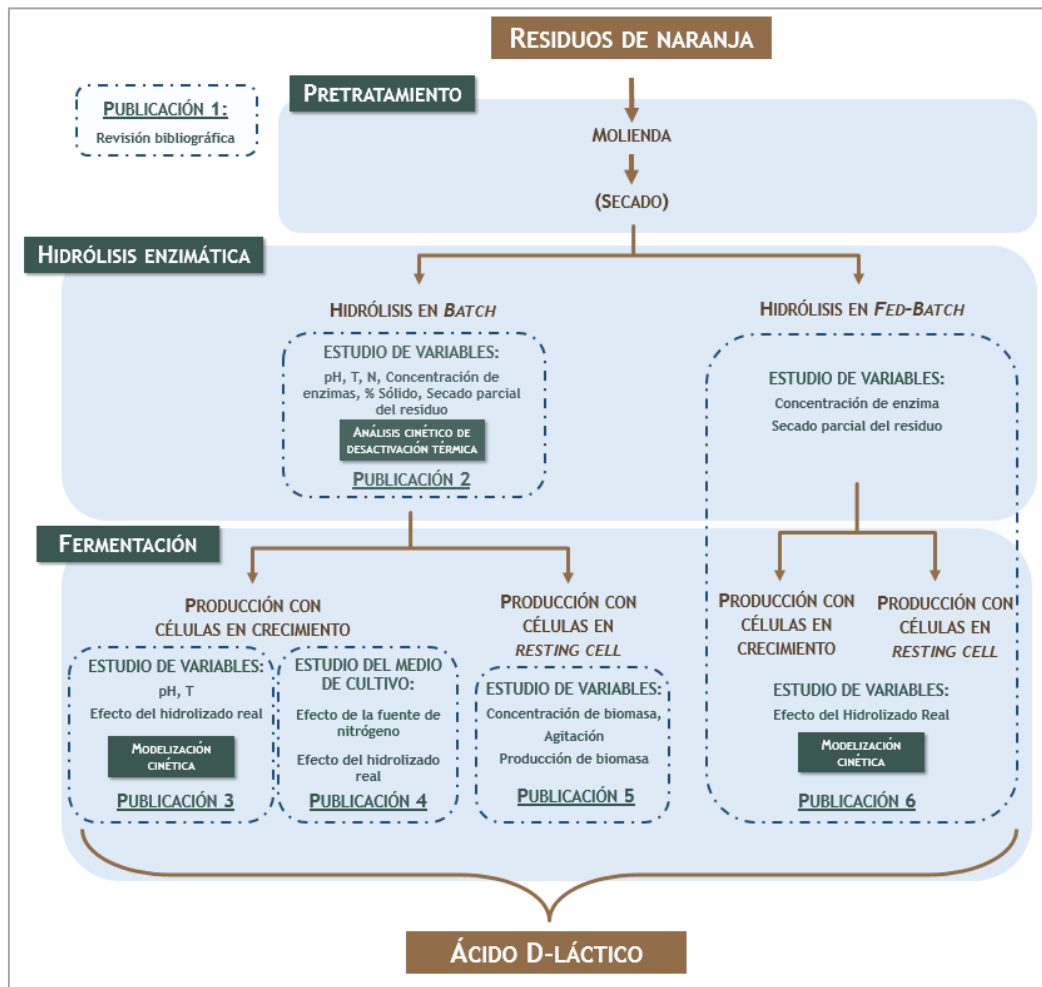


Figura 11. Esquema general del trabajo realizado en la presente Tesis doctoral, agrupado en las publicaciones donde se recoge dicho trabajo.

1. Estudio de la hidrólisis enzimática de residuos de naranja

El objetivo principal en esta etapa es obtener un hidrolizado que contenga una mezcla y concentración de azúcares óptima, para llevar a cabo posteriormente su fermentación para producir ácido D-láctico.

Los trabajos realizados dentro de este estudio de la etapa de hidrólisis enzimática de los residuos de naranja, se llevaron a cabo inicialmente en operación en discontinuo (*batch*), con el objetivo de determinar las variables más influyentes en el proceso y optimizarlas. Debido a la limitación en las concentraciones finales de los diversos azúcares presentes en los residuos, que una operación de hidrólisis de los mismos en *batch* proporciona, y que, en consecuencia, limitará la concentración final que se puede

obtener de ácido D-láctico; se abordó posteriormente un estudio enfocado a conseguir una mayor concentración de azúcares en el hidrolizado mediante el empleo de una operación en *fed-batch* en esta etapa inicial de hidrólisis.

1.1. Estudio de la hidrólisis enzimática en operación *batch*

Como punto de partida para el estudio de la etapa de hidrólisis enzimática, es necesario conocer la composición de la materia prima; por ello la empresa Biópolis S.L. llevó a cabo la caracterización del residuo de naranja empleado (que incluye tanto piel como pulpa). Los resultados obtenidos se incluyen en la Publicación 2 del Anexo, y muestran que estos residuos están constituidos por tres polímeros principales: celulosa (18,6 %), hemicelulosa (14,6 %) y pectina (18,6 %), pero que también cuentan con un alto porcentaje de glucosa y fructosa libres (35,2 %) en su composición. Debido al contenido en glucosa libre, para calcular los rendimientos y conocer el efecto de las distintas variables estudiadas en la hidrólisis enzimática, se decidió emplear la concentración de glucosa que proviene de la hidrólisis de la celulosa. Para ello, a la glucosa total medida, se la restó la glucosa que aparece en la primera muestra, ya que esta glucosa no procede en realidad de la sacarificación. Así, la glucosa que se libere al medio a lo largo de la hidrólisis, excluida la de los primeros instantes del proceso, se deberá a la acción sinérgica de glucanasas y β -glucosidasas sobre la celulosa, por lo que sirve como indicador de la eficacia de la hidrólisis. El estudio del proceso de hidrólisis en operación *batch*, se incluye en la Publicación 2 del Anexo.

La primera de las variables estudiadas fue el **pH**. Para el estudio de esta variable, se llevaron a cabo tres experimentos partiendo, en todos ellos, antes de la adición de las enzimas, de un valor de pH inicial de 5,0. En el primero de los experimentos, se dejó evolucionar libremente el pH, desde el valor de partida de 5,0; en el segundo experimento, una vez transcurridos 5 minutos respecto del momento de adición de las enzimas, se ajustó el valor del pH al valor inicial de 5, dejando el resto del experimento una evolución libre del mismo; y, en el último de los casos, se controló el pH en un valor de 5 durante todo el proceso. Los valores fijados del resto de variables fueron los siguientes: una temperatura de 50 °C, una agitación de 300 rpm, un porcentaje del 6,7 % en peso de sólido seco previamente molido y una mezcla de enzimas que consiste

en 47,5 $\mu\text{L/g}$ de Celluclast 1.5L, 55 $\mu\text{L/g}$ de Novozyme 188 y 42 $\mu\text{L/g}$ de Pectinex Ultra SP-L.

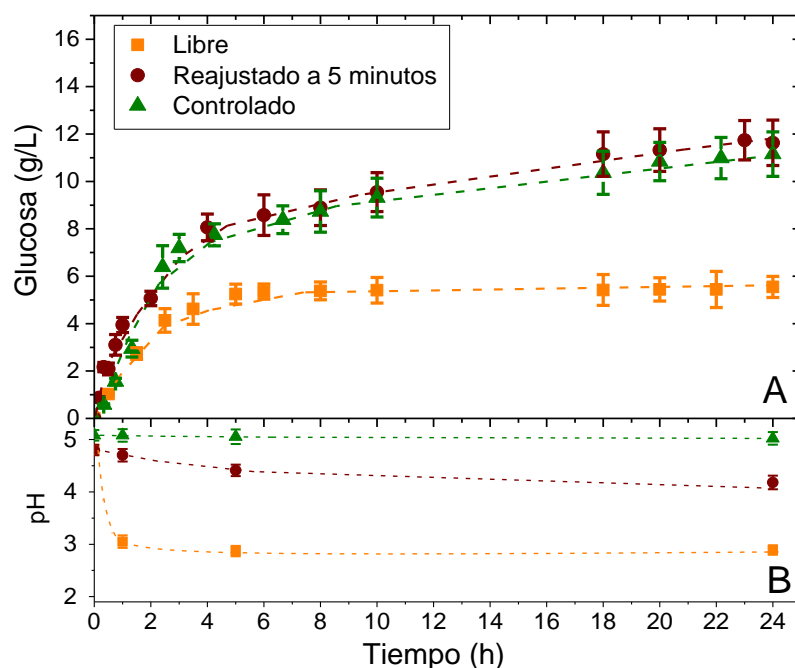


Figura 12. Resultados del estudio de la influencia del control del pH en la hidrólisis enzimática empleando un pH inicial de 5,0: A, evolución de glucosa; B, evolución del pH.

En la **Figura 12** se puede ver la evolución de la glucosa y del pH en función del tiempo para estos experimentos. En el primero de los experimentos, el pH disminuyó en una hora hasta un valor de 3, a causa del alto contenido en ácido cítrico y ácido galacturónico de los residuos de naranja, que se liberan al medio durante la hidrólisis, deteniéndose la reacción seguramente debido a la desactivación de las enzimas. Analizando la evolución del ácido cítrico mediante HPLC, se pudo observar que la mayor parte de este ácido se libera al medio durante los primeros minutos de reacción, lo que provoca la caída brusca del pH observada. Es por ello, que se trató de compensar ese efecto en el segundo experimento que se llevó a cabo ajustando el pH al inicio de la reacción y transcurridos los primeros 5 minutos (periodo en el que la mayor parte de ácido cítrico se había liberado); en la **Figura 12** se puede observar que el pH se mantiene a lo largo de toda la reacción en un valor superior a 4, permitiendo la liberación de glucosa a lo largo de toda la reacción, por lo que se comprueba que

mantener el pH por encima de un valor de 4 evita la desactivación de las enzimas. Por último, en el experimento donde el pH se controló en un valor de 5 durante todo el tiempo, se puede ver que la evolución de la glucosa es muy similar al caso anterior, por lo que el efecto conseguido para el proceso es el mismo y la actividad enzimática no se vio afectada.

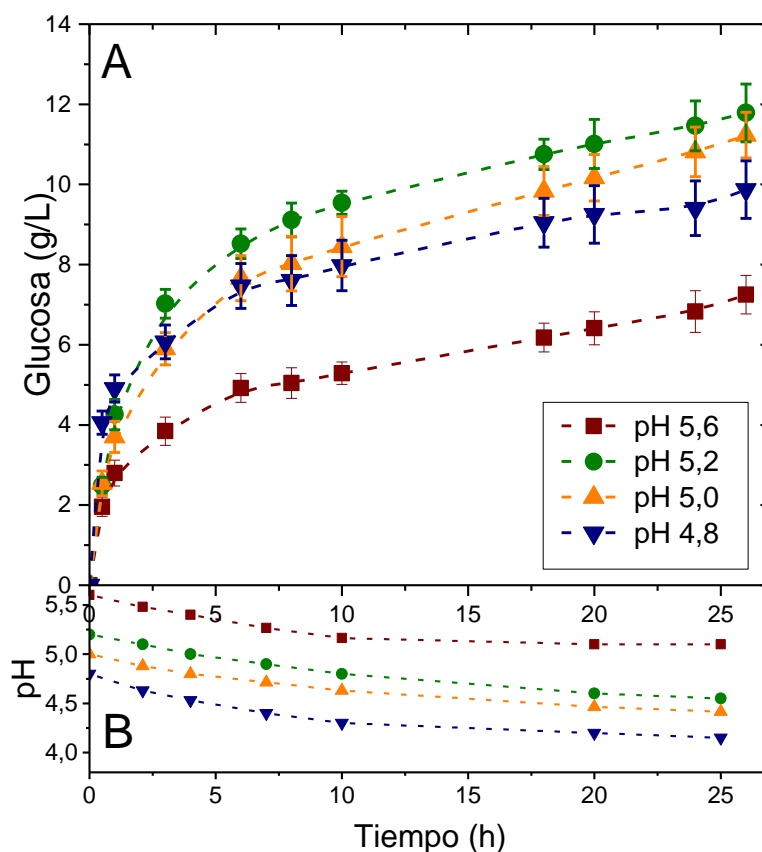


Figura 13. Efecto del pH en la evolución de glucosa (A) y del pH (B) con el tiempo durante la hidrólisis partiendo de diferentes valores iniciales del pH.

Por otra parte, aunque en los experimentos comentados se comenzó en un valor de 5,0; es necesario conocer el valor óptimo de partida del pH para llevar a cabo la hidrólisis. La estrategia de control empleada fue la de volver a ajustar el valor del pH a su valor inicial y transcurridos 5 minutos desde el comienzo de la reacción (4,8; 5,0; 5,2 y 5,6). El resto de variables se mantuvieron en los valores previamente comentados. Los resultados de producción de glucosa y evolución del pH con el tiempo, para todos los experimentos, se pueden ver en la **Figura 13**, en la que se puede

observar que la velocidad inicial de producción de glucosa en el proceso es mayor cuando éste comienza a un valor de pH de 4,8; sin embargo, la bajada del pH a lo largo del tiempo de hidrólisis, provoca que disminuya su velocidad de producción hasta valores por debajo de los obtenidos para los experimentos realizados con valores de pH inicial de 5,0 y 5,2. Los resultados del experimento llevado a cabo a un pH inicial de 5,6 muestran que este valor es demasiado elevado para el proceso de hidrólisis, provocando menores valores en la velocidad del proceso y el rendimiento en glucosa que en el resto.

Estos resultados están de acuerdo con la literatura consultada que indica que el pH óptimo de operación de estas enzimas es de 4,8; sin embargo, como el pH no se controla a lo largo de todo el experimento, este evoluciona a lo largo del proceso de hidrólisis hasta valores de 4,2 lo que ralentiza el proceso debido, seguramente, a una disminución de la actividad enzimática.

Como puede observarse en la **Figura 13B**, en los experimentos que parten de un pH inicial de 5,0 o 5,2 el valor de esta variable evoluciona hasta un pH cercano a 4,8 siendo, como ya se ha señalado, los experimentos que proporcionan mejores resultados en términos de producción de glucosa. Esto lleva a pensar que el rango óptimo de actividad enzimática se encuentra en valores de pH entre 4,8 a 5,2; eligiéndose como valor para emplear en el resto de estudios de las diferentes variables, un valor inicial de 5,2 debido a que es el que proporciona la mayor concentración de azúcares totales en el hidrolizado (ver Tabla 2 de la Publicación 2).

La segunda variable estudiada en la etapa de hidrólisis es la **temperatura**. El estudio del efecto de esta variable se llevó a cabo mediante la realización de diversos experimentos en un intervalo de 45 °C a 60 °C. Los valores del resto de las variables en el proceso fueron los siguientes: un pH inicial de 5,2 (reajustado a los 5 minutos del comienzo de la reacción), una agitación de 300 rpm, un porcentaje del 6,7 % en peso de sólido seco previamente molido (no secado, humedad del 80 %) y una mezcla de enzimas consistente en 47,5 µL/g de Celluclast 1.5L, 55 µL/g de Novozyme 188 y 42 µL/g de Pectinex Ultra SP-L. En la **Figura 14** se recogen los resultados de producción de glucosa obtenidos y se puede observar que, aunque los resultados de las velocidades de producción de glucosa durante las primeras de horas no presentan diferencias sustanciales a las cuatro temperaturas probadas, hay un máximo de rendimiento en

glucosa para el experimento realizado a 50 °C siendo, por lo tanto, ésta la temperatura determinada como óptima para llevar a cabo la etapa de hidrólisis enzimática de los residuos de naranja.

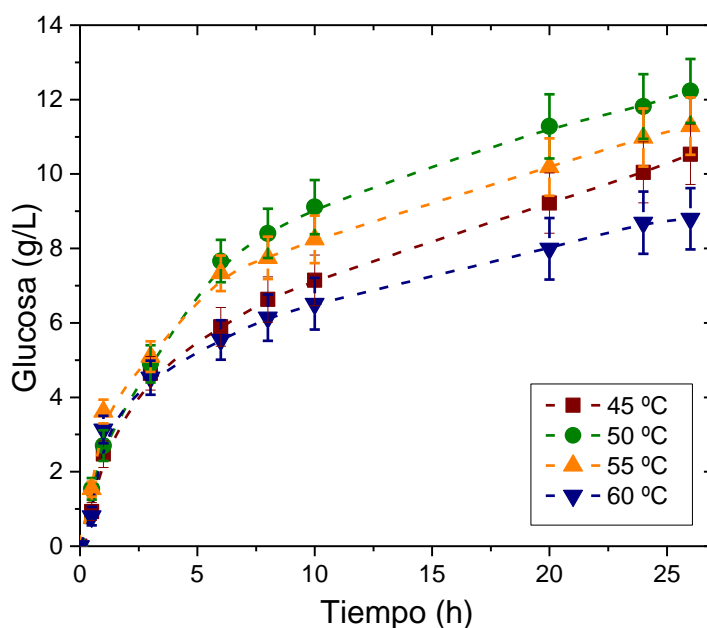


Figura 14. Efecto de la temperatura en la evolución de glucosa con el tiempo durante la etapa de hidrólisis en operación batch.

Una vez obtenidos los valores de temperatura y pH, se pasó a estudiar el **efecto de la agitación** en la hidrólisis. Para obtener buenos rendimientos en la hidrólisis de cualquier material lignocelulósico se necesita una buena mezcla que permita a la enzima actuar sobre el residuo, lo que implicaría trabajar a altas agitaciones. En este caso se realizaron 4 experimentos en un intervalo de valores de 100 rpm a 800 rpm; el resto de variables del proceso se fijaron en los mismos valores de los estudios previos, empleando los valores de pH y temperatura ya establecidos.

Los resultados de producción de glucosa en estos experimentos se recogen en la **Figura 15**; los resultados obtenidos muestran que con una agitación de 500 rpm se obtienen los mejores resultados de producción de glucosa; no presentando grandes diferencias con los correspondientes al experimento realizado a 300 rpm. Es de señalar

que en el caso de emplear 100 rpm se observa menor producción de glucosa, lo que apunta a que la velocidad global del proceso está limitada por el fenómeno de transferencia de materia. Sin embargo, lo más destacable es lo observado en el experimento llevado a cabo a 800 rpm, en el que la generación de la glucosa es menor a la obtenida a 300 y 500 rpm y parecida a la que se obtiene al trabajar a 100 rpm, incluso, algo menor, lo que deja patente que las enzimas sufren algún fenómeno de desactivación a elevados valores de agitación. Por todo ello, la agitación elegida para los siguientes estudios es 300 rpm, ya que comporta menor gasto energético que a 500 rpm y, como ya se ha apuntado, los resultados que proporcionan son muy similares en ambos casos.

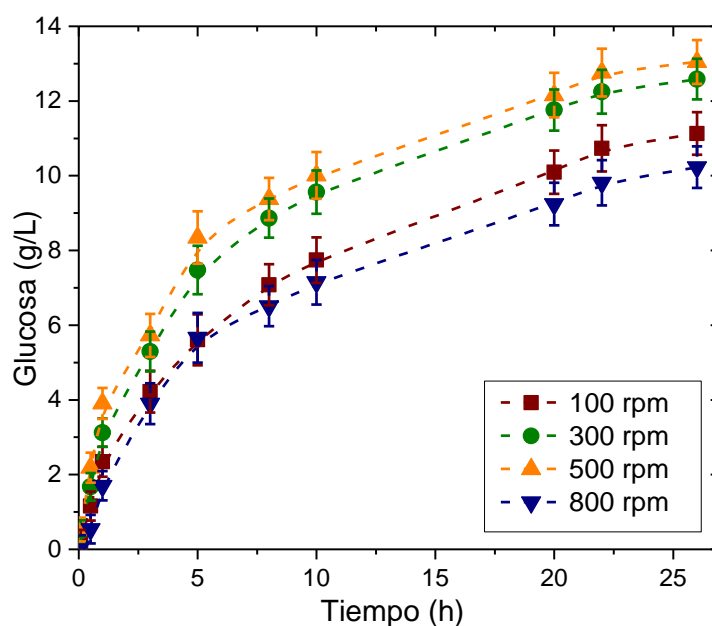


Figura 15. Efecto de la agitación en la evolución de glucosa con el tiempo durante el proceso de hidrólisis en operación batch.

Una vez determinados los valores de la temperatura, el pH y la agitación, se llevó a cabo el estudio del **efecto de la concentración de las enzimas**. El proceso de hidrólisis de sustratos complejos, como son los residuos de naranja, requiere más de un tipo de enzima para conseguir un hidrolizado con la mayor concentración de azúcares fermentables. La concentración y tipo de actividad de las enzimas empleadas

es un factor clave, ya que, además de repercutir en los rendimientos finales, supone uno de los mayores costes del proceso. Por ello, es necesario intentar reducir esta concentración sin comprometer los rendimientos. Para ello, se estudiaron cinco mezclas de las tres marcas comerciales empleadas en este trabajo (Celluclast 1.5L, Novozyme 188 y de Pectinex Ultra SP-L) a diferentes concentraciones. La concentración de cada enzima, para cada una de las mezclas con las que se ha trabajado en los experimentos se recoge en la **Tabla 9**. El resto de las variables se fijaron en los siguientes valores: un pH inicial de 5,2 (reajustado a los 5 minutos del comienzo de la reacción), una temperatura de 50 °C, una agitación de 300 rpm, un porcentaje del 6,7 % en peso de sólido seco previamente molido.

Tabla 9. Concentración de las enzimas presentes en cada una de las mezclas empleadas en los estudios de hidrólisis realizados en operación discontinua.

	CELLUCLAST 1.5 (μ L/g)	NOVOZYME 188 (μ L/g)	PECTINEX ULTRA SP (μ L/g)
MEZCLA 1	47,5	55,0	42,0
MEZCLA 2	23,7	27,5	20,5
MEZCLA 3	12,0	13,7	10,2
MEZCLA 4	6,0	7,0	5,1
MEZCLA 5	3,0	3,5	2,1

μ L/g; gramo de sólido seco.

En la **Tabla 10** se muestran los resultados obtenidos en la hidrólisis del residuo de naranja en los experimentos llevados a cabo con cada una de las mezclas enzimáticas, en términos de la concentración obtenida de cada monosacárido (glucosa, fructosa, galactosa y arabinosa), así como la concentración total de azúcares y el rendimiento final obtenido. En estos resultados, se puede observar que el empleo de una mayor concentración de enzima da lugar a rendimientos y concentraciones de azúcares mayores. Sin embargo, cabe destacar que una reducción de la cantidad total de enzimas empleadas de un 94 % (mezcla 5 con respecto a la mezcla 1), sólo provoca una reducción de los azúcares totales obtenidos de 7 g/L y del 15,4 % en el rendimiento.

Tabla 10. Rendimiento y concentraciones de cada uno de los monosacáridos (y su suma total, en g/L) obtenidos para cada una de las mezclas enzimáticas empleadas en los estudios de hidrólisis en batch al 6,7 % de sólido.

MONOSACÁRIDO (g/L)	MEZCLA 1	MEZCLA 2	MEZCLA 3	MEZCLA 4	MEZCLA 5
GLUCOSA	24,2	24,4	22,7	20,7	19,6
FRUCTOSA	16,6	16,5	15,9	16,5	15,9
GALACTOSA	2,7	2,4	1,6	1,6	1,5
ARABINOSA	4,1	3,5	2,8	3,11	2,8
TOTAL	47,6	46,8	43,0	42,0	39,8
RENDIMIENTO (%)	98,2	98,7	91,9	88,0	83,5

Por otra parte, se analizó la evolución con el tiempo de la concentración de glucosa obtenida en el proceso de hidrólisis, determinando los valores de las velocidades iniciales de producción de glucosa, en función, únicamente, de la concentración de celulasas presente en cada una de las mezclas de enzima utilizadas para la hidrólisis del residuo. Los resultados se muestran en la **Figura 16**, donde se observa una tendencia saturante, lo que indica que existe una limitación de la actividad celulasa; probablemente debida a la necesidad de actuación previa del resto de enzimas presentes en la mezcla, para evitar que parte de la celulosa presente en el residuo esté retenida o sea inaccesible a las celulasas debido a la presencia de hemicelulosa y/o de pectina.

Los residuos de naranja presentan un 80 % de humedad y la estructura de la cáscara es muy porosa, lo que complica poder trabajar con porcentajes de sólido seco elevados. Además, estos residuos son higroscópicos y, por tanto, la cantidad de agua que presentan puede aumentar debido a la estructura porosa y a la presencia de múltiples grupos alcohol en los polisacáridos que la componen. Por tanto, la concentración final de azúcares que se puede alcanzar es muy baja, aunque los rendimientos sean altos. Para evitar esta limitación, se propusieron diferentes estrategias para incrementar esta concentración final de azúcares: **aumentar el porcentaje de sólido en la hidrólisis** de un 6,7 % a un 10,1 % de sólido seco; y, por otro lado, **reducir la humedad del sustrato** (secado parcial de los residuos de naranja, disminuyendo su contenido en agua).

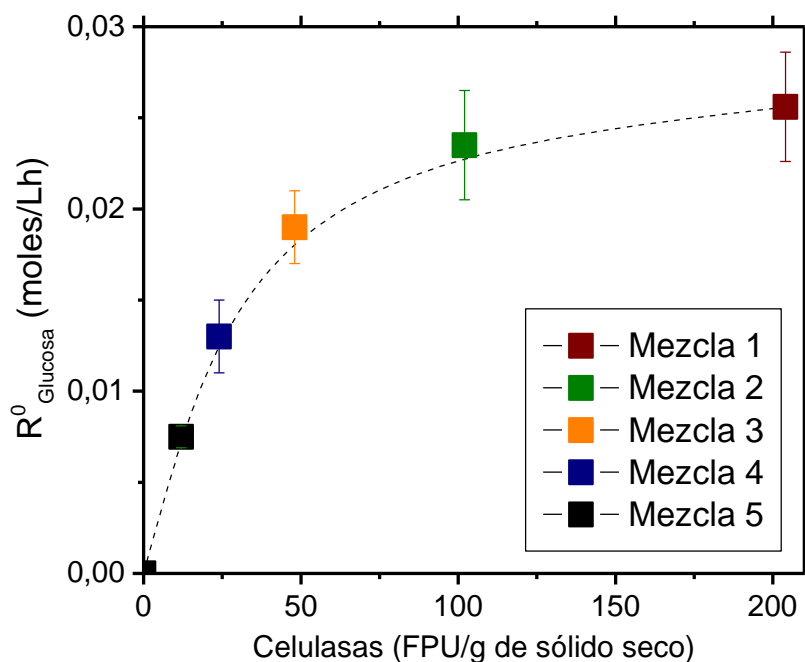


Figura 16. Efecto de la concentración de celulasas en la velocidad inicial de liberación de glucosa para cada una de las mezclas enzimáticas estudiadas en la hidrólisis en operación batch al 6,7 % de sólido.

En el primero de los casos, para **aumentar el porcentaje de sólido** en la hidrólisis, se llevaron a cabo 5 experimentos probando las distintas mezclas de enzimas, empleadas anteriormente y con un 10,1 % de sólido seco. Los resultados se muestran en la **Tabla 11** (ver también Figura 5 de la Publicación 2 incluida en el Anexo). Los resultados muestran que los rendimientos se mantienen por encima del 80 % al incrementar el porcentaje de sólido, cuando se opera con las concentraciones más altas de enzima (mezcla 1, 2 y 3) y, además, se consigue incrementar la concentración de azúcares finales unos 18 g/L, con respecto a los experimentos anteriores, llevados a cabo al 6,7 % de sólido seco. Como se puede observar en la tabla, se obtienen 65,5 g/L de azúcares totales en el mejor de los casos.

En los experimentos en los que se secó parcialmente la naranja, se llevaron a cabo con la menor concentración de enzima, la mezcla 5, y se probaron diferentes porcentajes de humedad de naranja (80; 75; 71,5; 66,7; 60 y 50 %), lo que conlleva un cambio en los porcentajes de sólido en el hidrolizado en función del agua eliminada (6,7; 7,1; 7,4; 7,7; 8,0 y 9,1 %, respectivamente). Los resultados se muestran en la

Figura 17. En este caso, se puede observar que también se consigue incrementar la concentración final de azúcares, obteniendo los mejores resultados en términos de rendimiento y concentración final al trabajar con residuo con un 60 % de humedad. En este caso, como se puede ver en la **Figura 17**, si se comparan los resultados con el experimento llevado a cabo con residuo fresco (80 % de humedad) al 6,7 % de sólido y con la máxima concentración de enzimas probada (mezcla 1), se consigue incrementar unos 5 g/L la concentración final de azúcares obtenida, aunque los rendimientos finales sean peores. En el caso de comparar estos resultados con llevado a cabo con la misma concentración de enzima (mezcla 5 y un 80 % de humedad) la mejora es todavía mayor, ya que se incrementa la concentración final de azúcares en 12 g/L.

Tabla 11. Rendimiento y concentraciones de cada uno de los monosacáridos (y su suma total, en g/L) obtenidos para cada una de las mezclas enzimáticas empleadas en los estudios de hidrólisis en batch al 10,1 % de sólido.

MONOSACÁRIDO (g/L)	MEZCLA 1	MEZCLA 2	MEZCLA 3	MEZCLA 4	MEZCLA 5
GLUCOSA	32,7	31,3	30,6	28,8	25,3
FRUCTOSA	22,6	22,3	22,1	21,9	21,1
GALACTOSA	4,1	3,6	2,6	2,3	2,3
ARABINOSA	6,1	5,3	4,4	4,2	4,2
TOTAL	65,5	62,5	59,7	57,2	52,9
RENDIMIENTO (%)	87,2	83,4	81,6	76,8	67,6

Con estos resultados las condiciones de operación determinadas para llevar a cabo la etapa de hidrólisis en discontinuo son las siguientes: 50 °C, 300 rpm, pH ajustado a 5,2 al inicio de la reacción y reajustado transcurridos los primeros 5 minutos, 10,1 % de sólido seco y emplear la mezcla de enzimas número 3. En estas condiciones se obtiene un hidrolizado con 30 g/L de glucosa, 22 g/L de fructosa, 3 g/L de galactosa y 4 g/L de arabinosa. Por tanto, esta será la mezcla de azúcares que se empleará para llevar a cabo el estudio de la etapa de fermentación, cuando se emplee un medio modelo, en lugar de un hidrolizado.

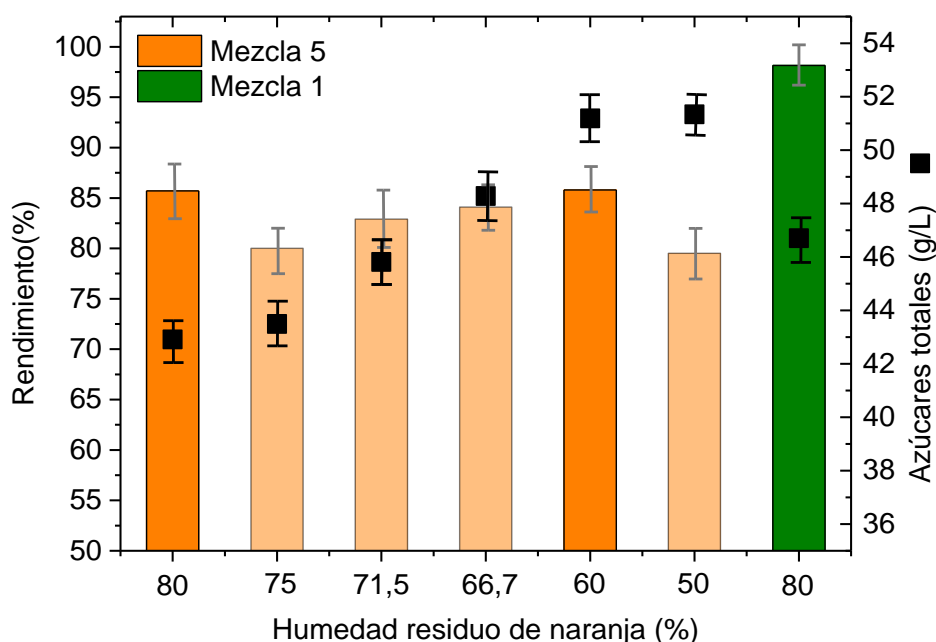


Figura 17. Efecto del secado parcial de residuo de naranja en los rendimientos obtenidos y la concentración final de azúcares obtenidos en la hidrólisis en operación batch al 6,7 % de sólido.

1.2. Estudio de la hidrólisis enzimática en operación *fed-batch*

Con el objetivo de incrementar la concentración final de azúcares, se estudió también la posibilidad de llevar a cabo el proceso de hidrólisis enzimática en operación *fed-batch*, incluyendo el estudio del efecto de emplear residuo parcialmente seco, a distintos porcentajes de humedad, lo que también contribuye a incrementar la concentración final de azúcares. Todo el trabajo que se detalla a continuación está recogido en la Publicación 3, del Anexo de esta Memoria.

Para estudiar el efecto del secado del residuo se llevaron a cabo cinco experimentos modificando el porcentaje de humedad del residuo empleado (80 % - residuo sin secar-, 75 %, 71,5 %, 66,7 % y 60 %) empleando la mezcla de enzimas 1, recogida en la **Tabla 12**. En todos los experimentos se añadieron cinco cargas de residuo (la inicial y 4 más) y las condiciones de operación empleadas fueron 50 °C, 300 rpm, y un pH inicial de 5,2 ajustado de nuevo transcurridos los primeros 5 minutos desde el inicio de la reacción. Por otro lado, se llevaron a cabo otros cinco experimentos, en las mismas condiciones descritas, pero empleando la mezcla de enzimas 5, recogida en **Tabla 12**.

Tabla 12. Concentración de las enzimas presentes en las mezclas estudiadas.

	CELLUCLAST 1,5		NOVOZYME 188		PECTINEX ULTRA SP	
	$\mu\text{L/g}^1$	$\mu\text{L/g}^2$	$\mu\text{L/g}^1$	$\mu\text{L/g}^2$	$\mu\text{L/g}^1$	$\mu\text{L/g}^2$
MEZCLA 1	47,5	9,5	55	11	42	8,4
MEZCLA 5	12	2,4	13,7	2,74	10,2	2,04

¹ $\mu\text{L/g}$ de sólido seco inicial; ² $\mu\text{L/g}$ de sólido seco final (tras añadir todas las cargas).

La forma de operación en *fed-batch*, además de para incrementar la concentración de azúcares final, fue planteada también con el objetivo de reducir la cantidad de enzimas, ya que esta es una manera de reutilizar las enzimas añadidas inicialmente, lo que conlleva a una reducción de los costes en el proceso. De esta manera, al comienzo de la reacción, con la primera carga del residuo, la cantidad de enzima empleada por gramo de sólido seco de residuo es muy alta, y a medida que se añaden el resto de las cargas, esta cantidad de enzima por gramo de sólido seco presenta en la hidrólisis se reduce. En la **Tabla 12** se puede observar la cantidad de enzima empleada por gramo de sólido seco inicial, y por gramo de sólido seco final.

Los resultados obtenidos en los experimentos llevados a cabo con la mezcla 1 de enzimas, se recogen en la **Tabla 13**, donde se observa la concentración final de cada uno de los monosacáridos, así como la concentración total de azúcares obtenidas. Los resultados de los experimentos llevados a cabo con la mezcla 5 de enzimas, se pueden observar en la **Tabla 14**.

Tabla 13. Concentración de los diferentes monosacáridos y de azúcares totales obtenidos tras 96 horas de hidrólisis en operación *fed-batch* con la mezcla 1 de enzimas.

HUMEDAD (%)	GLUCOSA (g/L)	FRUCTOSA (g/L)	GALACTOSA (g/L)	ARABINOSA (g/L)	AZÚCARES TOTALES (g/L)
80,0	51,3	25,7	7,2	8,0	92,2
75,0	61,3	29,8	8,0	8,4	107,5
71,5	63,0	31,3	9,7	9,1	113,1
66,7	65,0	35,6	10,7	10,2	121,5
60,0	68,4	47,3	12,2	12,8	140,7

Tabla 14. Concentración de los diferentes monosacáridos y de azúcares totales obtenidos tras 96 horas de hidrólisis en operación *fed-batch* con la mezcla 5 de enzimas.

HUMEDAD (%)	GLUCOSA (g/L)	FRUCTOSA (g/L)	GALACTOSA (g/L)	ARABINOSA (g/L)	AZÚCARES TOTALES (g/L)
80,0	40,5	26,4	6,1	5,2	78,2
75,0	44,6	28,9	5,0	5,4	83,9
71,5	45,4	32,1	5,9	5,0	88,4
66,7	51,9	35,9	7,1	7,1	102,0
60,0	55,9	47,9	9,3	8,1	121,2

En ambos casos la concentración de azúcares obtenida aumenta al ir introduciendo sucesivas cargas de sólido durante la operación *fed-batch*, obteniendo, en el peor de los casos, unos 80 g/L de azúcares finales y 140 g/L en el mejor. De hecho, el proceso en *fed-batch* no es el único responsable del incremento de la concentración de azúcares, sino que, en los experimentos llevados a cabo con un residuo con menor porcentaje de humedad, la concentración de cada uno de los azúcares en el líquido también aumenta. Sin embargo, existen diferencias dependiendo de la concentración de enzimas empleada (mezcla 1 y mezcla 5). En la **Figura 18** se muestran los rendimientos obtenidos para cada uno de las sacarificaciones, además de la concentración final de azúcares. En esta figura se puede observar que, al llevar a cabo la hidrólisis con la mezcla 5, que contiene una cantidad de enzimas menor, los rendimientos de sacarificación son bajos, en torno a un 50 %. A medida que se añaden cargas de residuo durante la hidrólisis, se observa que la enzima no es capaz de hidrolizar el nuevo sustrato (ver también Figura 1 de la Publicación 3). Por otro lado, como se ha apuntado en estudios previos, las enzimas presentan un proceso de desactivación térmica y posible bloqueo físico (por adsorción inespecífica), es decir, que durante tiempos de exposición prolongados de las enzimas al sólido y a las condiciones de operación, estas pueden perder su actividad de forma estructural y/o funcional. Estos fenómenos son más evidentes en procesos largos, como la operación en *fed-batch*. Sin embargo, la enorme cantidad de azúcares libres en los residuos de naranja permite obtener una elevada concentración de azúcares en el líquido sin necesitar de un alto rendimiento en la sacarificación. Por otro lado, los rendimientos que se obtienen empleando la mezcla 1, oscilan entre 80 y 95 %. Por tanto, aunque inicialmente la cantidad de enzima que se emplea es muy alta para una sola carga, lo

que podría hacer inviable un proceso desde el punto de vista económico, al reutilizar las enzimas añadiendo varias cargas, se reduce la cantidad de enzima empleada en última instancia.

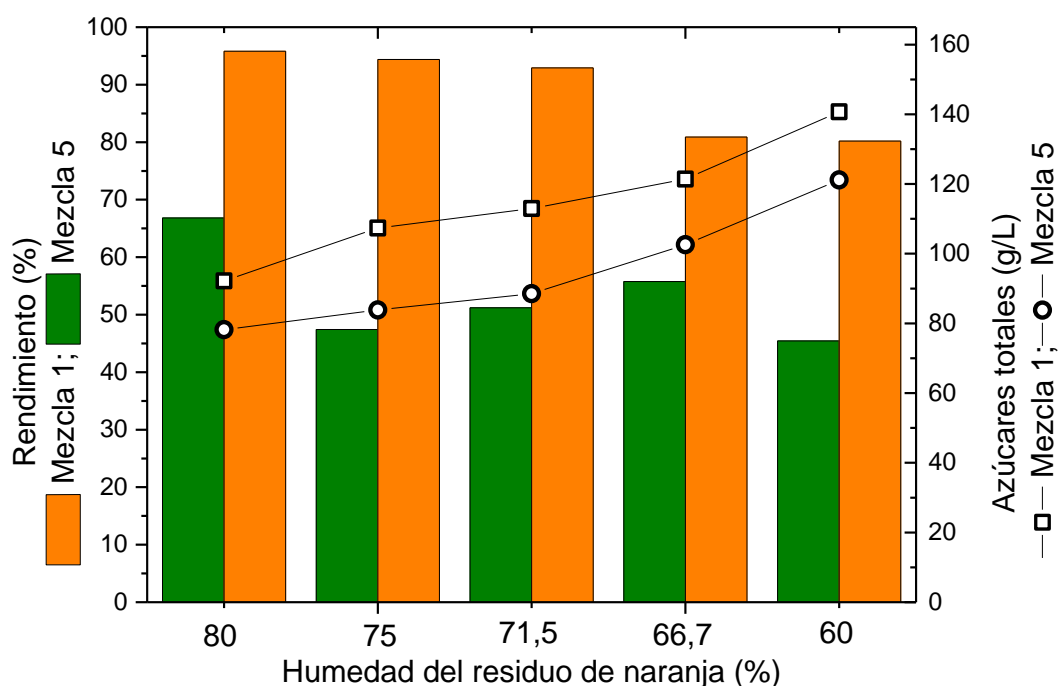


Figura 18. Comparación de los resultados (rendimientos en glucosa y azúcares totales) obtenidos en la hidrólisis de residuos de naranja en fed-batch en función de la mezcla enzimática empleada y de la humedad del residuo empleado.

En la **Figura 18** también se puede observar que emplear un residuo parcialmente seco tiene un efecto apreciable en la hidrólisis, independientemente de la mezcla de enzimas empleada, como ya se había observado en experimentos previos donde se operaba en *batch* con residuo a distintos porcentajes de humedad. Se aprecia que emplear un residuo parcialmente seco reduce los rendimientos. El tratamiento de los residuos del naranja con calor para retirar el agua presente puede alterar la morfología y estructura de material, reduciendo el tamaño de los poros y el agua disponible para la hidrólisis en varias zonas de cada partícula de residuo. La consecuencia lógica de estos fenómenos sería la reducción de los rendimientos de sacarificación.

En consideración al notable coste de las enzimas en procesos de hidrólisis enzimática, para realizar estudios de fermentación con hidrolizado obtenido en operación *fed-batch*, se opta por realizar cinco cargas de residuo al 60 % de humedad en las siguientes condiciones: 50 °C, 300 rpm, pH ajustado a 5,2 y la mezcla de enzimas número 5. El hidrolizado tiene la siguiente composición en monosacáridos: 60 g/L de glucosa, 40 g/L de fructosa, 9 g/L de galactosa y 8 g/L de arabinosa. Esta mezcla de azúcares será la preparada en el laboratorio para realizar experimentos de fermentación con un medio modelo que simule la composición de este hidrolizado obtenido en operación *fed-batch*.

2. Estudios de la etapa de Fermentación para la producción de ácido D-láctico

Como se comentó previamente, la otra etapa experimental que se ha estudiado en la presente Tesis Doctoral es la que corresponde a la producción de ácido D-láctico mediante fermentación, empleando la bacteria ácido-láctica *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* CECT 286. En los trabajos experimentales llevados a cabo para el estudio de esta etapa de fermentación, se han empleado tanto mezclas modelo de los monosacáridos procedentes de la hidrólisis, preparadas en el laboratorio, como hidrolizados reales del residuo de naranja obtenidos en el presente trabajo, tanto en operación discontinua como en *fed-batch*.

Con el objetivo de conseguir reproducibilidad experimental, en primer lugar, fue necesario poner a punto un método de preparación de los inóculos que se emplean posteriormente en los diversos estudios de producción de ácido D-láctico en los que caben dos posibilidades: en el primero de los casos, se permite la reproducción de las células mientras se produce la fermentación de la mezcla de azúcares para la obtención de ácido D-láctico (experimentos con **células en estado de crecimiento**); por otro lado, no se permite la reproducción de las células mientras se lleva a cabo la producción del ácido D-láctico mediante la fermentación de la mezcla de azúcares (experimentos con el microorganismo en **estado de resting cells**).

Para ordenar los diferentes estudios que se recogen en las publicaciones que conforman la presente Tesis Doctoral, la estructura del presente apartado se va a

realizar en función del estado de las células empleadas en la etapa de fermentación: crecimiento y *resting cells*.

A lo largo de los resultados que se exponen en los siguientes apartados se han utilizado los parámetros de rendimiento (R), selectividad (S) y productividad (P) que se definen según las siguientes ecuaciones:

$$R (\%) = \frac{\text{Concentración de ácido D-láctico } (\frac{g}{L})}{\text{Concentración de azúcares } (\frac{g}{L})} \times 100 \quad (\text{Eq. 7})$$

$$S (\frac{g}{g}) = \frac{\text{Concentración de ácido D-láctico } (\frac{g}{L})}{\text{Concentración de azúcares consumidos } (\frac{g}{L})} \quad (\text{Eq. 8})$$

$$P (\frac{g}{Lh}) = \frac{\text{Concentración de ácido D-láctico } (\frac{g}{L})}{\text{Tiempo (h)}} \quad (\text{Eq. 9})$$

2.1. Empleo de células en estado de crecimiento

Las variables estudiadas en el proceso de producción de ácido D-láctico empleando células en estado de crecimiento se pueden agrupar en **variables de operación** (temperatura y pH) y **composición del medio de producción** (fuente de nitrógeno y empleo de mezcla modelo de monosacáridos o de hidrolizado). A continuación, se exponen los resultados obtenidos en los estudios realizados.

2.1.1 Influencia de las variables de operación

Como se ha señalado anteriormente, se llevaron a cabo sendos estudios relativos tanto a la influencia de la **temperatura** (en botellas, en el intervalo de 35 a 47 °C) como del **pH** (en biorreactor, controlado en valores dentro del intervalo de 5,0 a 6,2) en la etapa de fermentación. Estos resultados se recogen en la Publicación 4 del Anexo.

En cuanto al estudio de la **influencia de la temperatura**, los experimentos se realizaron en botellas de 100 mL de volumen, empleando 50 mL del medio de cultivo MRS (cuya composición se recoge en la Tabla 7 del presente documento), que es un medio específico para el crecimiento de *Lactobacillus*. Para poder simular la composición en azúcares de un hidrolizado de residuo de naranja, el medio MRS se suplementó con 10 g/L de glucosa (para alcanzar una concentración de 30 g/L), 22 g/L

de fructosa, 4 g/L de galactosa y 4 g/L de arabinosa. Las condiciones de operación fueron: 200 rpm, el pH se mantuvo en un valor por encima de 5, por la adición de 50 gramos de CaCO_3 en cada botella y la atmósfera fue anaeróbica, al desplazar el oxígeno de las botellas con nitrógeno. Los valores de temperatura estudiados fueron 35, 37, 40, 43 y 47 °C. En la **Tabla 15** se presentan los resultados obtenidos en términos de: concentración de ácido D-láctico; selectividad (definida según la Ecuación 8) productividad (definida según la Ecuación 9) y pureza.

Los resultados muestran que la temperatura óptima para llevar a cabo la producción de ácido D-láctico se encuentra entre 37 °C y 40 °C, valores en los que los resultados obtenidos son muy parecidos, presentando, un valor de concentración de ácido láctico ligeramente mayor a 40 °C (51,9 g/L) que a 37 °C (50,5 g/L).

Tabla 15. Resultados obtenidos para el estudio de la influencia de la temperatura en la etapa de fermentación (en botella con CaCO_3 , 200 rpm y empleando un medio modelo de mezcla de azúcares provenientes de una hidrólisis en discontinuo).

TEMPERATURA (° C)	ÁCIDO LÁCTICO (g/L)	S (g/g)	P (g/(L·h))	PUREZA (%)
35	44,3	0,84	1,8	95,5
37	50,5	0,85	2,1	95,9
40	51,9	0,88	2,2	95,9
43	49,3	0,84	2,0	93,9
47	39,1	0,82	1,7	93,4

En cuanto al estudio de la **influencia del pH**, se realizaron un total de seis experimentos (5,0; 5,2; 5,5; 5,8; 6,0 y 6,2) en un biorreactor comercial controlando durante todo el proceso el valor del pH, mediante la actuación del controlador del equipo, por adición de NaOH 5 M y/o HCl 2 M. Los experimentos fueron realizados empleando el mismo medio de cultivo comentado para los estudios de la influencia de la temperatura y una temperatura de 40 °C, una agitación de 200 rpm y condiciones de anaerobiosis, ya que se desplazó el oxígeno del medio mediante el burbujeo de nitrógeno. Los resultados obtenidos en este estudio se muestran en la **Tabla 16**, en la que se observa que a un valor de pH de 5,8 se obtienen los máximos valores de concentración, rendimiento y productividad.

Tabla 16. Resultados obtenidos para el estudio de la influencia del pH en la etapa de fermentación (en biorreactor a una temperatura de 40 °C, 200 rpm y empleando un medio modelo de mezcla de azúcares provenientes de una hidrólisis en discontinuo).

pH	ÁCIDO LÁCTICO (g/L)	S (g/g)	P (g/(L·h))	PUREZA (%)
5,0	38,6	0,75	1,6	98,4
5,2	42,1	0,75	1,8	97,5
5,5	49,7	0,87	2,0	98,5
5,8	51,3	0,88	2,6	97,3
6,0	49,8	0,87	2,5	97,1
6,2	50,4	0,87	2,55	98,1

En cuanto a la pureza del isómero D- obtenido, los resultados muestran que ésta no se ve afectada por ninguna de las variables estudiadas, ya que en todos los experimentos el porcentaje de isómero D- fue superior al 90 %.

2.1.2. Estudio del medio de producción

A continuación, se llevaron a cabo estudios relativos a la fuente de nitrógeno a emplear en el medio de cultivo y al uso del residuo de naranja hidrolizado obtenido de la etapa de hidrólisis enzimática previa.

Como se ha comentado, las bacterias lácticas tienen ciertos requerimientos nutricionales y necesitan altas concentraciones de fuente de nitrógeno y vitaminas, lo que supondrá un alto coste del proceso. Debido a ello, se planteó estudiar el **efecto de la concentración y el tipo de fuente de nitrógeno** empleada, incluyendo en el estudio tanto los compuestos presentes en el medio MRS (peptona -PEP-, extracto de levadura -YE- y extracto de carne -ME-), como *corn steep liquor* -CSL- (licor de maíz, residuo del procesado de maíz con un alto contenido en vitaminas, minerales y nitrógeno orgánico), debido a su bajo coste. Estos resultados se encuentran en la Publicación 5 del Anexo.

Para llevar a cabo este estudio, en primer lugar, se planteó estudiar si alguna de las fuentes complejas de nitrógeno presentes en el medio MRS era imprescindible para la producción del ácido D-láctico. Para ello, se realizaron tres experimentos en botella empleando el medio MRS suplementado con los monosacáridos que permiten simular un hidrolizado de residuos de naranja obtenido en *batch*, pero eliminando

completamente uno de los tres componentes que aportan nitrógeno orgánico (PEP, YE o ME). Además se llevó a cabo un experimento control, en el que la composición de fuentes nitrogenadas del medio de cultivo MRS no se modificó. El resto de condiciones de operación fueron las siguientes: 40 °C; 200 rpm y el pH mantenido en un valor superior a 5 por adición de CaCO_3 . Los resultados se recogen en la **Figura 19**, donde se muestra la evolución de la biomasa, glucosa, fructosa y galactosa, y el producto con el tiempo, es destacable que la evolución de la arabinosa no se muestra en ninguna figura, ya que el microorganismo empleado no es capaz de consumirla. En dicha figura, se puede observar que el experimento llevado a cabo sin peptona proporciona unos resultados muy parecidos a los correspondientes al experimento control, por lo que en los siguientes experimentos se prescindió de este compuesto en el medio de producción. Por otro lado, estos resultados sugieren que la importancia del aporte de una u otra fuente de nitrógeno, no radica solo en la concentración de nitrógeno, sino también en su composición en aminoácidos, el tamaño de sus péptidos y las vitaminas presentes en la misma.

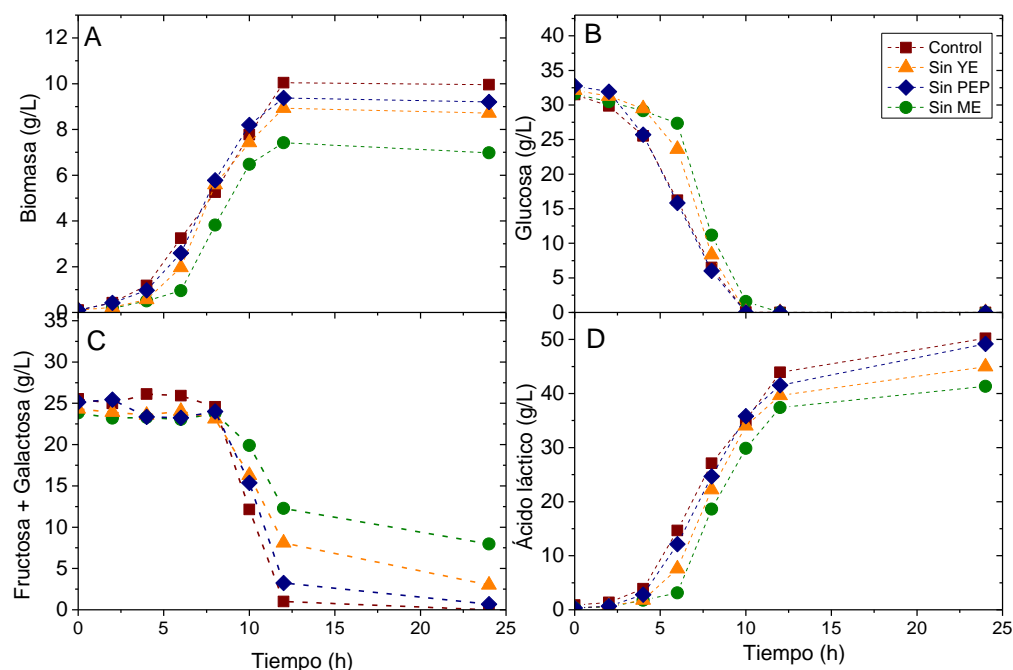


Figura 19. Efecto de la eliminación del extracto de carne, extracto de levadura o peptona del medio de cultivo MRS en la etapa de producción de ácido D-láctico por fermentación a un pH controlado en 5,8, 40 °C y 200 rpm, empleando células en estado de crecimiento y una mezcla de azúcares modelo de la composición del hidrolizado obtenido en operación batch.

La segunda etapa de este estudio, una vez descartada la peptona para llevar a cabo el proceso, se realizó manteniendo en el medio de cultivo el extracto de levadura y el extracto de carne, además, también se incluyó en el estudio el *corn steep liquor* por su bajo coste en el mercado. Para determinar el efecto de estas fuentes de nitrógeno en la producción de ácido D-Láctico, se llevaron a cabo 15 experimentos en botella introduciendo como fuente de nitrógeno solo uno de estos tres compuestos (YE, ME, CSL) a cinco concentraciones de nitrógeno total para cada una de ellas (0,12; 0,36; 0,6; 1,2 y 2,64 g/L), siendo la concentración de cada una de estas fuentes de nitrógeno diferente para conseguir el mismo contenido en nitrógeno total, debido a sus diferencias de composición. En la **Tabla 17**, se muestran los resultados obtenidos para estos experimentos, relativos al porcentaje de fructosa y galactosa consumida (ya que son los monosacáridos con mayor dificultad para ser consumidos), las concentraciones de biomasa y de ácido láctico.

Los resultados muestran, por una parte, que un mayor aporte de nitrógeno total, independientemente del compuesto empleado para ello, incrementa las concentraciones obtenidas de biomasa y ácido D-láctico, así como el consumo de azúcares. Por otro lado, los resultados también muestran diferencias en función del compuesto empleado como fuente de nitrógeno, principalmente entre los experimentos que se llevaron a cabo añadiendo ME o YE y aquellos en los que se adicionó al medio CSL (siempre comparando las mismas concentraciones de nitrógeno total): la biomasa final obtenida en los experimentos llevados a cabo con CSL siempre es inferior a la obtenida en experimentos equivalentes realizados con YE o ME; la concentración de biomasa influye en la velocidad de consumo de los azúcares, por ello, cuando se emplea CSL se observa que el porcentaje de azúcares consumido es menor que cuando se emplean YE o ME. Esto tiene efecto en la producción de ácido láctico, observando que, en general, su producción es menor cuando se emplea CSL a todas las concentraciones probadas. La presencia de aminoácidos y péptidos de pequeño peso molecular suelen ser más fáciles de asimilar por las bacterias que proteínas de gran tamaño. Tanto el extracto de levadura como el extracto de carne tienen mayor cantidad de aminoácidos libres y proteínas de bajo peso molecular, que el *corn steep liquor*. Por otro lado, las bacterias lácticas requieren generalmente vitaminas del grupo B como riboflavina, piridoxina o ácido pantoténico entre otros. Entre las fuentes de nitrógeno estudiadas, se sabe que el extracto de levadura, además de ser una excelente fuente de

nitrógeno también cuenta con un alto contenido en diferentes vitaminas del grupo B. Además, hay aminoácidos que son esenciales para el crecimiento de algunas bacterias, los cuales pueden estar presentes en una fuente de nitrógeno y no en otra. Por tanto, el mayor crecimiento de la biomasa y los mejores resultados que se obtiene al trabajar con extracto de levadura y el extracto de carne se deben a estas diferencias en su composición.

Tabla 17. Resultados experimentales obtenidos para los experimentos llevados a cabo con distinta fuente de nitrógeno y a distintas concentraciones.

FUENTE DE NITRÓGENO			RESULTADOS		
	TOTAL (g/L)	CONTENIDO EN NITRÓGENO (g/L)	CONSUMO FRU + GAL (%)	BIOMASA (g/L)	ÁCIDO LÁCTICO (g/L)
MRS	4/10/8	2,64	100	9,05	50,2
ME	22	2,64	100	10,21	50,5
	10	1,20	95	7,48	48,5
	5	0,60	81	5,53	44,1
	3	0,36	57	3,89	35,0
	1	0,12	28	2,42	30,2
YE	22	2,64	100	10,60	49,2
	10	1,20	87	7,35	47,3
	5	0,60	73	4,97	42,4
	3	0,36	49	3,75	37,7
	1	0,12	27	2,25	27,3
CSL	37,7	2,64	100	7,07	50,0
	17	1,20	67	4,78	40,8
	8,5	0,60	63	3,65	35,6
	5,1	0,36	42	2,98	32,3
	1,7	0,12	20	1,93	25,7

Por último, para poder elegir la mejor fuente de nitrógeno y su concentración se procedió a la **determinación del coste unitario de producción** (por tonelada de ácido láctico), basado únicamente en el coste de la composición en términos de fuente de nitrógeno, tomando como referencia el precio de mercado actual de ácido D-láctico que es de 1300 \$/tonelada. Los resultados obtenidos se recogen la **Figura 20**, en la que se muestran los valores de rendimientos en ácido D-láctico y el coste unitario calculado para los 15 experimentos llevados a cabo. En esta figura se puede observar lo señalado hasta el momento, siendo destacable que para una concentración de nitrógeno total de 2,64 g/L, la máxima estudiada, la diferencia en el valor del rendimiento entre los tres compuestos estudiados es prácticamente nula; mientras que el coste unitario presenta

valores muy distintos; mostrando que el empleo de ME es absolutamente inviable económicamente, mientras que el uso de CSL es el más ventajoso desde este punto de vista. Este contenido en nitrógeno equivale a trabajar con 37 g/L de *corn steep liquor*, obteniendo rendimientos del 80 % y 50 g/L de ácido D-láctico a un coste de 80 \$/tonelada.

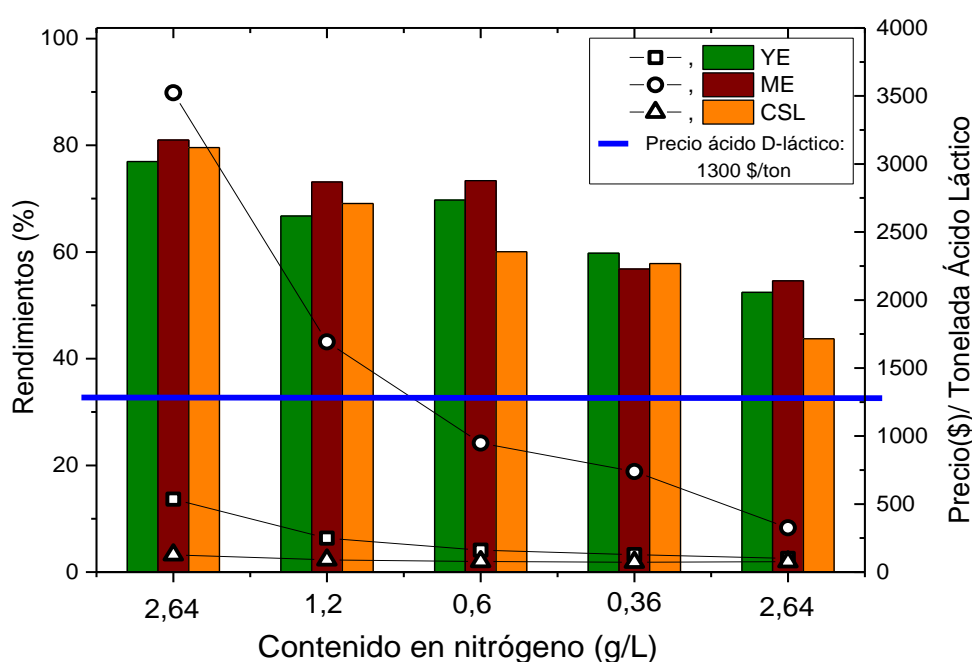


Figura 20. Rendimientos obtenidos para cada uno de los experimentos llevados a cabo modificando la fuente de nitrógeno frente a los costes que supone esa fuente de nitrógeno.

Una vez establecidas las condiciones de operación óptimas de temperatura y pH; y determinada la composición necesaria del medio de cultivo a emplear en la producción de ácido D-láctico, en cuanto a la fuente de nitrógeno se refiere, se abordó el estudio sobre el empleo del residuo hidrolizado obtenido en la etapa enzimática previa. El primer objetivo es comprobar si el proceso de producción de ácido D-láctico, con *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* CECT286, se inhibe en presencia del hidrolizado. Para ello, se procedió a realizar un experimento en biorreactor con el hidrolizado (obtenido en operación *batch*, según el procedimiento establecido en el capítulo anterior) con los siguientes valores de las variables: una temperatura de 40 °C,

un pH controlado en un valor de 5,8; 200 rpm de agitación, suplementando el medio de cultivo con los componentes del medio MRS. Estos resultados se recogen en la Publicación 4 del Anexo. En la **Figura 21** se puede observar la evolución con el tiempo de los sustratos, producto y biomasa, obtenidos tanto para el experimento realizado con el hidrolizado, como para la mezcla modelo de monosacáridos equivalente a ese hidrolizado, llevados a cabo en las mismas condiciones experimentales. En la citada figura se puede observar que la evolución de todos los compuestos y de la biomasa es muy similar para ambos casos, por lo que se puede concluir que el empleo del residuo hidrolizado, obtenido en operación *batch*, para la etapa de fermentación con células en estado de crecimiento no presenta ningún tipo de inhibición en la velocidad del proceso y añadiendo todos los componentes del medio bibliográfico MRS.

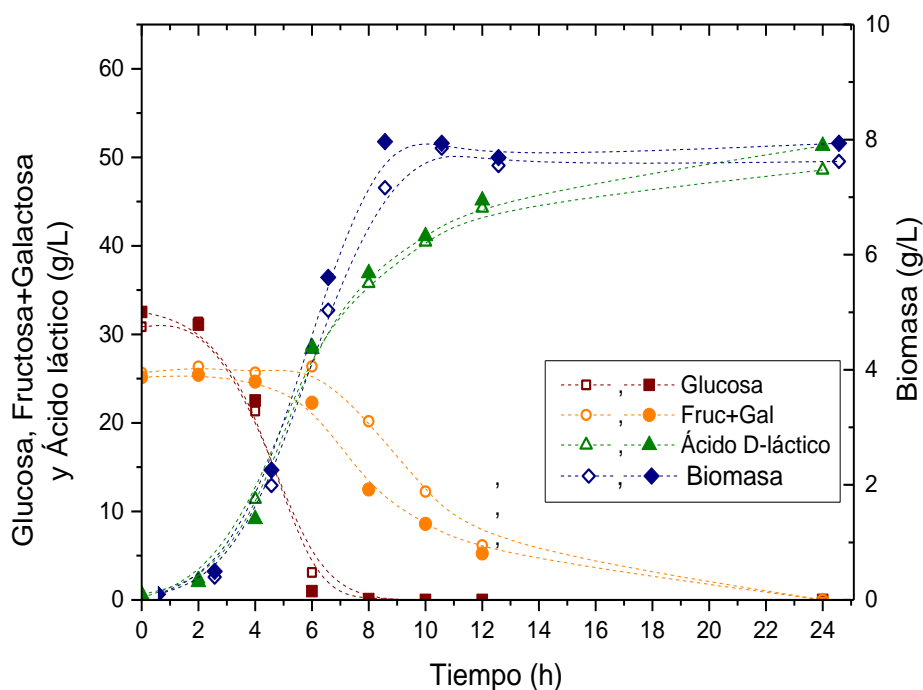


Figura 21. Comparación de los resultados obtenidos tanto con un medio modelo con la composición en monosacáridos del residuo hidrolizado (símbolos cerrados), como con el residuo de naranja hidrolizado (símbolos abiertos), ambos suplementados con **medio MRS** con células en estado de crecimiento (pH controlado en 5,8; 40 °C y 200 rpm).

El segundo objetivo es la sustitución por CSL de los componentes del medio MRS, como se ha determinado previamente. Los resultados de estos experimentos se incluyen en la Publicación 4 del Anexo de esta memoria. En la **Figura 22** se comparan los resultados obtenidos en experimentos llevados a cabo con CSL y empleando en un

caso, el medio modelo y en el otro el residuo hidrolizado. Se puede observar que cuando se emplea el hidrolizado se produce una fase de latencia más larga, aunque la biomasa llega a la misma concentración final, lo que repercute en la productividad obtenida, que es ligeramente inferior en el caso de emplear el residuo hidrolizado).

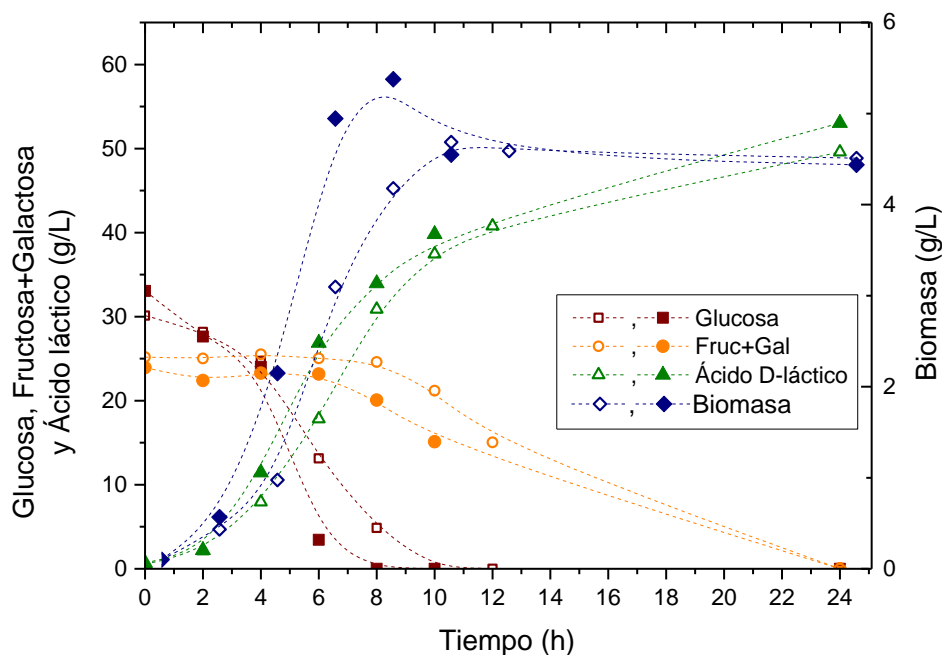


Figura 22. Comparación de los resultados obtenidos con el medio simulando la concentración de azúcares del hidrolizado (símbolos cerrados) y los resultados obtenidos empleando hidrolizado de naranja (símbolos abiertos), ambos suplementados **con CSL** con células en estado de crecimiento (pH controlado en 5,8; 40 °C y 200 rpm).

El último estudio llevado a cabo sobre la etapa de fermentación empleando células en estado de crecimiento, abordó el empleo de **residuos de naranja hidrolizados obtenidos en operación *fed-batch***, es decir, el hidrolizado con el que se plantea trabajar en este caso, tiene mayor concentración de azúcares. Esto podría presentar la ventaja de que la concentración de ácido D-láctico que se puede obtener es más alta, lo que reduciría los volúmenes de trabajo para una misma producción de este ácido, así como los costes de purificación. Sin embargo, el residuo hidrolizado obtenido con esta forma de operación en la etapa enzimática, además de tener una mayor concentración de azúcares, también presenta una concentración superior en ácido cítrico, lignina, y otros compuestos que podrían inhibir el proceso repercutiendo en los rendimientos y/o productividad del mismo.

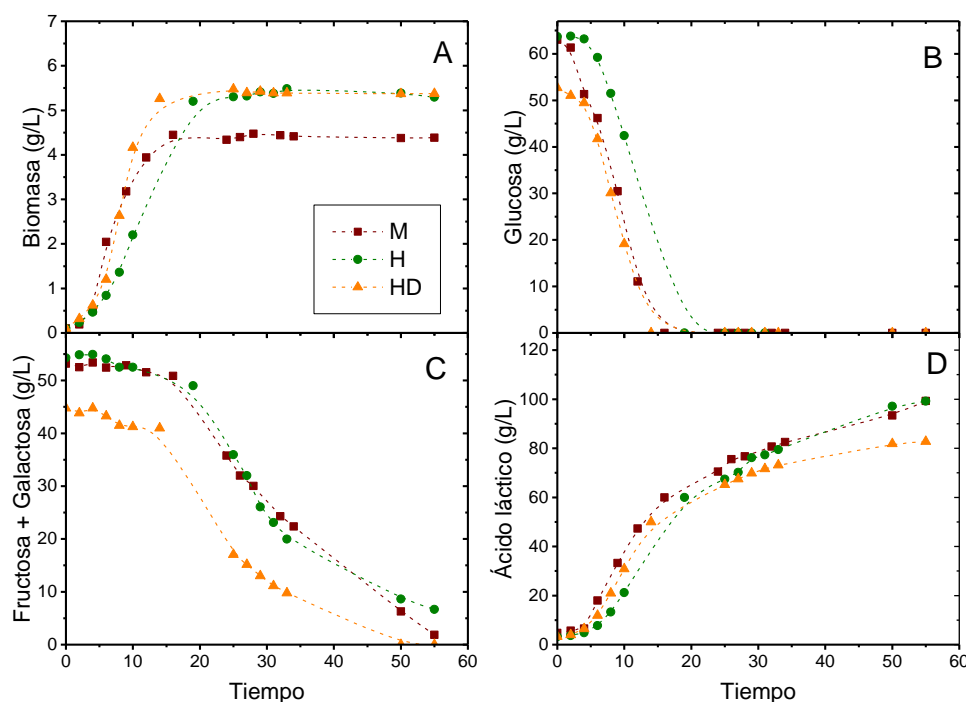


Figura 23. Resultados experimentales obtenidos con células en estado de crecimiento empleando un medio modelo (M), el residuo hidrolizado obtenido en operación *fed-batch* (H) y el mismo residuo hidrolizado diluido al 80 % (HD).

El trabajo realizado sobre este estudio de la fermentación, partiendo de hidrolizados más concentrados, se encuentra recogido en la Publicación 3 del Anexo. En este caso, se llevaron a cabo tres experimentos: el primero de ellos, como experimento control, se llevó a cabo la producción con un medio modelo con la misma composición en monosacáridos obtenidos en el residuo de naranja hidrolizado en operación *fed-batch* (M); en segundo lugar, se empleó este hidrolizado concentrado sin dilución (H); y por último, se empleó el hidrolizado diluido con agua al 80 % (HD). En todos los casos el medio empleado se suplementó con 37 g/L de *corn steep liquor*. Los experimentos se realizaron en biorreactor, a una temperatura de 40 °C, 200 rpm de agitación, manteniendo el pH en 5,8 por adición de NaOH 5 M o HCl 2 M y retirando el oxígeno al burbujear una corriente gaseosa de nitrógeno.

En la **Figura 23** se muestra la evolución en el tiempo de los diferentes compuestos (biomasa, glucosa, fructosa+galactosa y ácido D-láctico; la evolución de la arabinosa no se incluye debido a que, en ninguno de los casos, se consume) para cada uno de los experimentos. Estos resultados muestran algunas diferencias entre los

experimentos en los que se emplea el hidrolizado y en el que se emplea el medio modelo: como ocurría anteriormente, la presencia del hidrolizado implica un mayor tiempo de fase de latencia del microorganismo (**Figura 23A**), que se puede observar también en las primeras horas del consumo de glucosa (**Figura 23B**). Por otro lado, en los experimentos que se emplea el hidrolizado real, la biomasa alcanzada en la fase estacionaria de crecimiento es mayor, lo que se puede explicar por la presencia de proteínas en las cáscaras de la naranja. En cuanto a los resultados obtenidos en el experimento llevado a cabo con el hidrolizado diluido, se puede observar que la velocidad de crecimiento es mayor con respecto a los otros dos experimentos, seguramente debido a una inhibición por la alta concentración de sustrato. En la evolución del resto de componentes, no se observan diferencias entre los resultados obtenidos (únicamente las razonables en términos de concentración final de ácido láctico, ya que la concentración de azúcares de partida es menor) por lo que se puede concluir que emplear un hidrolizado más concentrado permite obtener elevadas concentraciones de ácido D-láctico en la etapa de fermentación, lo que favorecerá la purificación del producto.

2.2. Empleo de células en estado de *resting cells*

Una vez optimizada la producción de ácido láctico con células en estado de crecimiento, se estudió la posibilidad de llevar a cabo la producción trabajando con células en estado de *resting cells*. El empleo de las células en este estado, conlleva que no se permita el crecimiento de la biomasa. Para ello, se elimina del medio de producción la fuente de nitrógeno, es decir, no se suplementa el medio de producción con CSL, por lo que se reducirán los costes relativos a la composición del medio de producción y a la etapa de purificación. Por tanto, el medio de producción está formado únicamente por la mezcla de monosacáridos (en el medio modelo con tampón fosfato) o el hidrolizado de residuos de naranja. El proceso con el microorganismo en estado de *resting cells* se lleva a cabo en dos etapas: la primera de producción de biomasa, en la que hay crecimiento del microorganismo; y una segunda etapa de producción de ácido D-láctico por fermentación donde, en este caso, las células producidas en la primera etapa se encontrarán en estado de *resting cells*.

Debido a que, en los estudios realizados con células en estado de crecimiento, se determinaron los valores óptimos de temperatura y pH para la obtención de ácido D-láctico, estos valores se mantuvieron en los estudios llevados a cabo con las células en estado de *resting cells*. Por tanto, en estudio el posible **efecto de la velocidad de agitación** empleada en el proceso, así como la **concentración de biomasa** empleada, al ser una variable más del proceso, ya que su concentración no dependerá de la capacidad de crecimiento del microorganismo. Los resultados obtenidos en este estudio se recogen en la Publicación 6 del Anexo.

En estos experimentos, la etapa de producción de la biomasa, se llevó a cabo en biorreactor, empleando MRS como medio de cultivo para el crecimiento y siguiendo el procedimiento recogido en el apartado de Materiales y Métodos de la presente Memoria. Para el estudio de las variables comentadas en la etapa de producción, se llevaron a cabo siete experimentos en biorreactor a una temperatura de 40 °C, un valor de pH inicial de 5,8 controlado mediante adición de NaOH 10 M y en condiciones de anaerobiosis al desplazar el oxígeno con nitrógeno al inicio de cada experimento. Se hizo un primer bloque experimental manteniendo la agitación en un valor de 200 rpm empleando varias concentraciones de biomasa (3, 5, 8, y 10 g/L); el segundo bloque experimental se llevó a cabo con una concentración de biomasa de 10 g/L, empleando varios valores de agitación (200, 400, 600 y 800 rpm). Debido a que el proceso se lleva a cabo con células en estado de *resting cells*, el medio de producción empleado fue una mezcla de monosacáridos que simula la concentración de azúcares obtenida en el residuo hidrolizado en operación discontinua (30 g/L de glucosa, 22 g/L de fructosa, 4 g/L de galactosa y 4 g/L de arabinosa), disueltos en tampón fosfato.

Los resultados obtenidos en estos experimentos se recogen en la **Tabla 18**, en la que se muestran los valores del rendimiento (R), selectividad (S), productividad (P), las velocidades de consumo de glucosa y de fructosa+galactosa, así como los porcentajes de consumo de fructosa+galactosa (ya que la glucosa se consume por completo en todos ellos). En la **Tabla 18** se puede observar que los valores de todas las variables mencionadas, aumentan al incrementar tanto la concentración de biomasa, como la agitación empleadas. Los mejores resultados se obtienen al emplear una concentración de 10 g/L de biomasa y una agitación de 600 rpm (87 % de rendimiento y una productividad de 2.3 g/Lh). La evolución con el tiempo de estos

experimentos se puede ver en las Figuras 1 y 2, incluidos en la Publicación 6 del Anexo.

Tabla 18. Resultados obtenidos en la etapa de producción para los experimentos llevados a cabo a distintas agitaciones y concentraciones de biomasa en estado de *resting cells*.

N (rpm)	C _x (g/L)	R (%)	S (g/g)	P (g/(L·h))	CONSUMO FRU+GAL (%)	VELOCIDAD DE CONSUMO GLU (g/(L·h))	VELOCIDAD DE CONSUMO FRU+GAL (g/(L·h))
200	3	59,4	0,96	1,0	28,3	1,4	0,6
200	5	61,7	0,91	1,2	41,4	2,0	0,6
200	8	77,7	0,93	1,7	77,3	2,7	0,9
200	10	80,8	0,94	1,7	85,8	4,7	1,0
400	10	84,0	0,95	2,0	91,2	7,0	1,3
600	10	87,3	0,95	2,3	96,1	7,0	1,3
800	10	86,7	0,94	2,3	99,3	7,3	1,5

Sin embargo, cabe resaltar que, mientras que la glucosa se consume totalmente en todos los experimentos realizados en este estudio, en el caso de la de fructosa y la galactosa, el microorganismo no es capaz, en ningún caso, de consumirlo por completo en el tiempo del experimento. Además de que la glucosa alcanza velocidades de consumo de 7 g/Lh, mientras que la fructosa y galactosa presentan velocidades de consumo inferiores. Estos primeros resultados parecen indicar que la capacidad de las células de consumir fructosa es el fenómeno limitante de la producción de ácido D-láctico con células en estado de *resting cells*. Por ello, se planteó un estudio enfocado a la **adaptación del microorganismo al consumo de este monosacárido en la etapa previa de preparación del inóculo** ya que, hasta el momento, el crecimiento de la biomasa se había llevado a cabo en medio de cultivo MRS con glucosa únicamente como fuente de carbono

Según la literatura consultada, los microorganismos del género *Lactobacillus* cuentan con tres tipos de transportadores, responsables del consumo de glucosa y fructosa, que son: **Glucosa-PTS** (*phosphotransferase system*, sistema fosfotranseferasa), transportador específico de glucosa; **Fructosa-PTS**, que es un transportador específico de fructosa; **Manosa-PTS**, que es un transportador que puede

introducir los siguientes azúcares en orden de mayor a menor afinidad: glucosa, 2-desoxi-D-glucosa, manosa, glucosamina y fructosa.

Es de suponer, entonces, que cuando el crecimiento se lleva a cabo empleando glucosa, el microorganismo desarrollará transportadores específicos de glucosa (glucosa-PTS), por tanto, las células presentarán mayor capacidad de transporte de ese monosacárido. Sin embargo, si se emplea fructosa como fuente de carbono durante la etapa de crecimiento para obtener el inóculo, se podría conseguir un cultivo microbiano que haya desarrollado transportadores específicos para este otro monosacárido.

Tabla 19. Estudios realizados sobre la influencia en la producción de ácido D-láctico (empleando células en estado de resting cells) del acondicionamiento de las células al consumo de fructosa como fuente de carbono en la etapa de preparación de inóculo.

MEDIO INÓCULO	PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO							
	GLU (g/L)	FRU (g/L)	C _x (g/L)	N (rpm)	R (%)	P (g/(L·h))	VELOCIDAD CONSUMO GLU (g/(L·h))	VELOCIDAD CONSUMO FRU+GAL (g/(L·h))
MRS con Glucosa	-	20	5	200	85	1,3	-	1,5
	-	40	5	200	80	1,3	-	1,6
	-	60	5	200	78	1,0	-	1,2
	30	30	5	200	77	1,9	3,9	1,1
	30	60	5	200	57	2,0	3,9	1,3
MRS con Fructosa	-	20	5	200	82	2,1	-	2,5
	-	40	5	200	87	2,5	-	2,5
	-	60	5	200	90	2,1	-	2,4
	30	30	5	200	94	2,9	3,9	2,2
	30	60	5	200	79	2,5	3,8	2,1

Para comprobar el efecto en la producción de ácido D-láctico de las células, obtenidas empleando diferentes fuentes de carbono (glucosa o fructosa), en estado de *resting cells*, se realizaron diez experimentos donde la etapa de producción de biomasa se llevó a cabo con medio MRS empleando glucosa, en cinco de ellos, y en los otros cinco se sustituyó por fructosa, según se recoge en la **Tabla 19**; manteniendo una concentración de 5 g/L de biomasa, una agitación de 200 rpm y empleando diferentes concentraciones de azúcares (glucosa y/o fructosa) en tampón fosfato. Los resultados obtenidos (rendimiento, productividad y velocidades de consumo de los distintos azúcares) se recogen en la misma tabla. Además, los resultados de estos experimentos

se incluyen en la 6 del Anexo. En estos resultados, es destacable que las velocidades de consumo de fructosa+galactosa, conseguidas en los experimentos realizados con un inóculo crecido con fructosa, son claramente superiores al caso de obtener las células empleando glucosa. Además, es de destacar que el empleo de fructosa en la producción de las células no influye en la velocidad de consumo de glucosa, cuando la producción de ácido D-láctico se lleva a cabo con una mezcla de glucosa y fructosa, siendo la glucosa el azúcar que se consume siempre en primer lugar.

Una vez determinado el procedimiento para la obtención de las células para ser empleadas en estado de *resting cells*, se llevaron a cabo experimentos de producción de ácido D-láctico, empleando el residuo de naranja hidrolizado obtenido en la etapa de sacarificación enzimática previa en operación discontinua, o bien la concentraciones de los monosacáridos que se encuentran presentes en el residuo hidrolizado, es decir, un medio modelo como control.

Tabla 20. Resultados obtenidos para la producción de ácido D-láctico, empleando células crecidas en presencia de fructosa en empleadas en estado de *resting cells*, cuando se utilizad como medio de producción el medio modelo y el residuo de naranja hidrolizado en operación batch.

	MEDIO MODELO	HIDROLIZADO
RENDIMIENTO (%)	90	88
PRODUCTIVIDAD (g/(L·h))	4,2	6,7
VELOCIDAD DE CONSUMO DE GLUCOSA (g/(L·h))	5,6	7,7
VELOCIDAD DE CONSUMO FRU+GAL (g/(L·h))	4,0	6,6

Los resultados se muestran en la **Tabla 20**, en la que se puede observar que las células, producidas empleando fructosa como fuente de carbono en la etapa de obtención del inóculo, proporcionan buenos resultados tanto en el experimento control, como en el caso del empleo del residuo hidrolizado. El aumento observado en los valores obtenidos para las variables mostradas en la tabla cuando se emplea el residuo hidrolizado frente al medio modelo, se debe a que en el residuo de naranja se favorece que se produzca un cierto crecimiento del microorganismo (debido a la presencia de compuestos nitrogenados en el residuo), aunque se trate de llevar a cabo el proceso en condiciones que mantengan las células en estado de *resting cells*. Estos resultados se recogen en la Publicación 6 del Anexo.

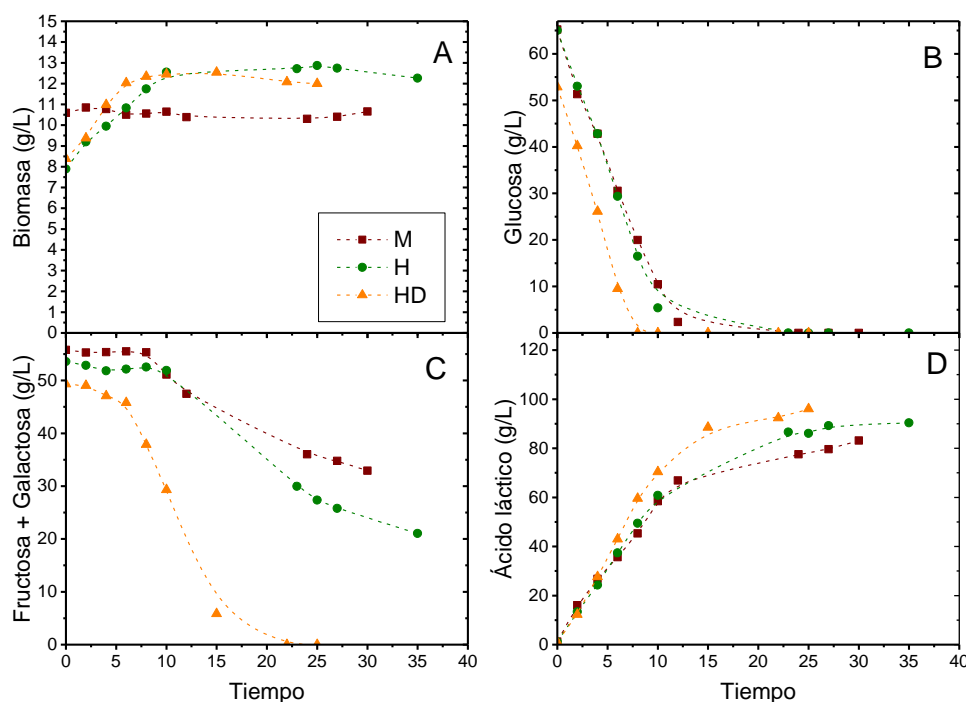


Figura 24. Resultados experimentales obtenidos con células en estado de resting cells empleando un medio modelo (M), residuo hidrolizado obtenido en operación fed-batch (H) y residuo hidrolizado diluido al 80 % (HD).

De igual forma a lo llevado a cabo en el caso del empleo de células en estado de crecimiento, se trató de mejorar la concentración del ácido D-láctico obtenida mediante el aumento de la concentración de azúcares en el residuo hidrolizado, empleando para ello el obtenido en operación *fed-batch*. Se realizaron tres experimentos en biorreactor empleando, de nuevo, un medio modelo con la composición de azúcares de ese residuo hidrolizado como control (M) y, por otra parte, el residuo de naranja hidrolizado en operación *fed-batch* sin diluir (H) y con una dilución con agua correspondiente al 80 % de su concentración (HD). Estos resultados se encuentran en la Publicación 3 del Anexo. El resto de variables en estos experimentos fueron: 40 °C, atmósfera anaeróbica (por burbujeo de nitrógeno) y un pH de 5,8, mantenido por adición NaOH 10 M y/o HCl 2 M. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 24** donde se puede ver la evolución con el tiempo de la biomasa, el ácido D-láctico y los azúcares presentes en el medio. En esta figura cabe destacar, en primer lugar, que en el caso de emplear el residuo hidrolizado se observa que la biomasa (**Figura 24A**) aumenta en los dos experimentos realizados con el residuo hidrolizado (H y HD) debido, como se ha apuntado previamente, a la presencia

de proteínas en los residuos de naranja, que el microorganismo emplea como fuente de nitrógeno. Además, al igual que sucedía en los experimentos realizados con células en estado de crecimiento (por la introducción de CSL en el medio) en el caso de no diluir el residuo hidrolizado, se vuelve a observar menor velocidad de crecimiento, aunque la concentración de biomasa alcanzada en la fase estacionaria no presenta diferencias.

Por otra parte, es destacable que, tanto el consumo de glucosa (**Figura 24B**) como la producción de ácido D-láctico (**Figura 24D**) obtenidos en los dos experimentos de concentración de monosacáridos más elevada (medio modelo y residuo hidrolizado en operación *fed-batch*; M y H, respectivamente en la figura) no hay diferencias significativas. Sin embargo, cabe resaltar el gran aumento que se produce en la velocidad de consumo de la mezcla de fructosa y galactosa (**Figura 24C**) debido a la dilución del residuo hidrolizado. La velocidad de consumo de estos azúcares es menor en el caso de utilizar el medio modelo sintético (en el que no hay compuestos tóxicos provenientes de la hidrólisis del residuo de naranja) y empleando el medio hidrolizado sin diluir, lo que indica un efecto inhibitorio debido a la elevada concentración de monosacáridos.

Tabla 21. Resultados obtenidos en los experimentos de producción de ácido D-láctico, llevados a cabo con células en estado de crecimiento y de resting cells, empleando altas concentraciones de monosacáridos.

	CRECIMIENTO			RESTING CELLS		
	ÁC. LACT. (g/L)	R (%)	P (g/(L·h))	ÁC. LACT. (g/L)	R (%)	P (g/(L·h))
MEDIO MODELO	86,85	81,81	1,62	71,82	66,37	2,39
100% DE HIDROLIZADO	83,16	83,16	1,57	78,03	73,06	2,60
80% DE HIDROLIZADO	72,77	81,19	1,82	81,34	89,70	3,70

En la **Tabla 21** se muestran los resultados obtenidos en términos de concentración del ácido D-láctico, rendimiento y productividad, tanto para los experimentos realizados con el microorganismo en estado de *resting cells*, como para aquellos realizados en las mismas condiciones, pero utilizando células en estado de crecimiento. Es importante destacar que, cuando se comparan los valores de la productividad, el empleo de células en estado de *resting cells* destaca de forma

significativa, en especial cuando se utiliza el residuo de naranja hidrolizado diluido obtenido en operación *fed-batch*, siendo además el que proporciona el mayor valor de rendimiento de todos los experimentos mostrados en la **Tabla 21**.

3. Modelización de las etapas del proceso

3.1. Etapa de hidrólisis

En el trabajo con un residuo tan complejo como son los residuos de naranja, frente a los sustratos puros, es complicado conocer que factores pueden estar interviniendo en la liberación de los azúcares por acción de las enzimas. Anteriormente, los resultados apuntaban a una desactivación térmica de las enzimas y, debido a la complejidad del residuo, se ha propuesto llevar a cabo un análisis cinético del proceso de sacarificación, incluyendo también una posible desactivación enzimática de orden 1, bien total o bien parcial. Este análisis se ha llevado a cabo, por un lado, para la reacción en la que la celulosa libera glucosa, teniendo en cuenta la actividad endo- y exoglucanasa (celulasas) y β -glucosidasa; mientras que, por otro lado, se ha analizado la actividad pectinolítica mediante la liberación de ácido galacturónico. Para ello se ha propuesto un modelo cinético fractal, que permite explicar la hidrólisis de este tipo de residuos, donde no se cumple la ley de acción de masas debido a que los procesos reactivos son superficiales, no volumétricos, y la geometría del propio sólido, además de su heterogénea y cambiante composición, ralentizan progresivamente la sacarificación. De esta manera, se proponen las siguientes ecuaciones:

$$\frac{dY}{dt} = k_i a_r (1 - Y) \quad (\text{Eq. 10})$$

$$k_i = k t^{-h} \quad \forall \quad t > 1 \quad \vee \quad k_i = k \quad \forall \quad 0 \leq t \leq 1 \quad (\text{Eq. 11})$$

donde k es la constante cinética, Y el rendimiento del monómero de estudio (glucosa o ácido galacturónico) y a_r es la actividad remanente. Por último, h , es la constante o exponente fractal, cuyo valor se relaciona con la accesibilidad de las enzimas al sólido y la reactividad de este, de tal manera que los valores altos de h implican que la velocidad de la reacción química disminuye notablemente a causa de la reducción de accesibilidad de las enzimas al sustrato y/o a la reducción de su reactividad por enriquecimiento en la fracción inerte (cenizas, proteínas, lignina).

Tabla 21. Parámetros obtenidos del ajuste llevado a cabo para la evolución de la glucosa (desactivación parcial) y del ácido galacturónico (desactivación total) a distintas temperaturas.

PARÁMETRO	MODELO DESACTIVACIÓN PARCIAL: GLUCOSA	MODELO DESACTIVACIÓN TOTAL: ÁCIDO GALACTURÓNICO
$\text{Ln}k_0$	$15,75 \pm 3,10$	$13,08 \pm 0,58$
$E_a/R (k_0)$	5.634 ± 1.002	4.689 ± 188
H	$0,41 \pm 0,04$	$-0,01 \pm 0,02$
$\text{Ln}k_{d0}$	$163,72 \pm 24,41$	$56,38 \pm 1,04$
$E_a/R (k_d)$	154.469 ± 8.050	19.002 ± 346
B	$0,26 \pm 0,05$	-----

Para el estudio del fenómeno de desactivación se proponen: la Ecuación 12 para describir una desactivación total y, la Ecuación 13, para una desactivación parcial:

$$a_r = e^{-k_d t} \quad (\text{Eq. 12})$$

$$a_r = \beta(1 - e^{-k_d t}) + \beta \quad (\text{Eq. 13})$$

Una vez planteado el modelo cinético, se llevaron a cabo los ajustes de las Ecuaciones 10 y 12 a los datos experimentales, tanto para la reacción de liberación de glucosa, como para la liberación de ácido galacturónico. Además, se llevó a cabo el mismo procedimiento para las Ecuaciones 10 y 13. Los resultados de los ajustes se encuentran como material suplementario de la Publicación 2, incluida en el Anexo de esta Memoria, donde se indica el valor de los distintos parámetros cinético y los valores estadísticos obtenidos: F-Fisher, RMSE (Root of Mean Squared Error) y % VE (porcentaje de variación explicado). Considerando estos resultados, se puede indicar que existe una desactivación parcial para las actividades glucanasas y β -glucosidasas y, en el caso de la actividad pectinolítica, la desactivación es total. En la **Figura 25** se muestra la evolución de los datos experimentales junto con los valores estimados por el modelo para la concentración de glucosa a diferentes temperaturas, ajustado a las Ecuaciones 10 y 12. La evolución de ácido galacturónico se puede apreciar en la **Figura 26**, donde se incluyen los datos predichos por el modelo propuesto (Ecuaciones 10 y 13). Los parámetros cinéticos calculados para ambos ajustes se recogen en la **Tabla 22**.

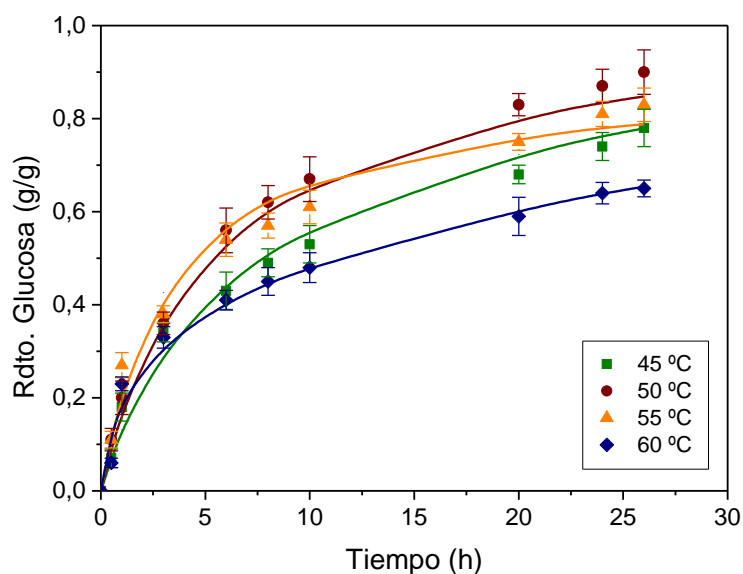


Figura 25. Rendimiento de glucosa a diferentes temperaturas desde 45 °C a 60 °C: en puntos los resultados experimentales; en líneas los datos predichos por el modelo.

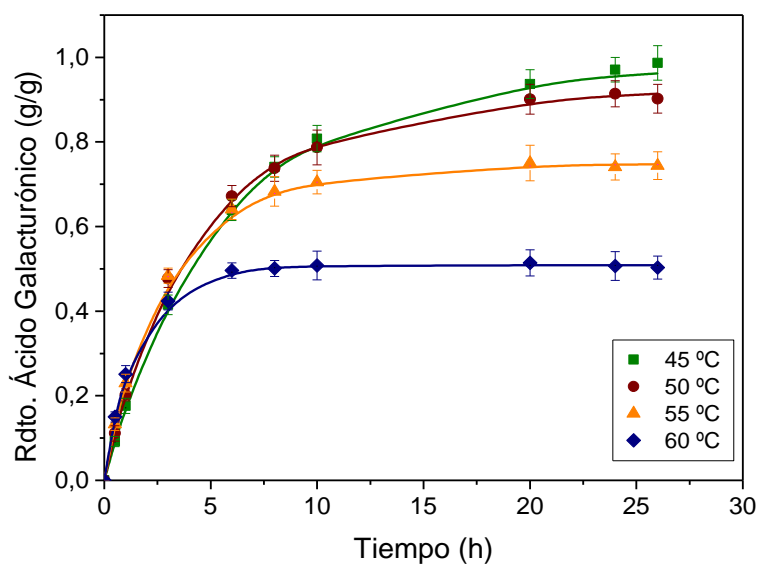


Figura 26. Rendimiento de ácido galacturónico a diferentes temperaturas desde 45 °C a 60 °C: en puntos los resultados experimentales; en líneas los datos predichos por el modelo.

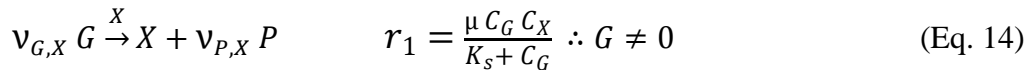
3.2. Etapa de Fermentación

La propuesta de un modelo cinético del proceso de fermentación requiere el planteamiento de un esquema de reacción y la asignación de una ecuación cinética para cada uno de las reacciones consideradas en el citado esquema, empleando la

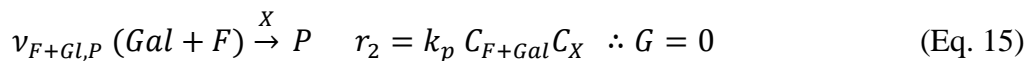
metodología general de la Ingeniería de la Reacción Química para estudio de redes de reacciones.

A lo largo de todo el trabajo experimental, mostrado en la presente Memoria, se ha observado un patrón repetitivo en la evolución de los diferentes compuestos que se puede dividir en dos partes, que se comentan a continuación.

En primer lugar, se consume la glucosa (no consumiendo ningún otro monosacárido hasta que ésta desaparece del medio) obteniéndose crecimiento del microorganismo (en los experimentos llevados a cabo con células en estado de crecimiento y cuando se utiliza el residuo hidrolizado empleando el microorganismo en estado de *resting cells*) a la vez que producción de ácido D-láctico. En todos los experimentos llevados a cabo con células en estado de crecimiento se observa que el cultivo entra en la fase estacionaria cuando la glucosa se agota siendo esta, por tanto, el sustrato limitante del mismo (proponiéndose su descripción mediante la ecuación empírica de Monod). Esta transformación se puede expresar según el siguiente modelo, que considera una producción de ácido D-láctico a partir de glucosa, de forma asociada al crecimiento y es aplicable desde el inicio del proceso hasta que se agota la glucosa en el caldo de fermentación:



En segundo lugar, una vez finalizado el crecimiento microbiano, se consumen la fructosa y la galactosa (la arabinosa no se consume en ningún experimento realizado) dando también lugar a la producción de ácido D-láctico. Esta reacción se puede representar mediante el siguiente modelo:



Por lo tanto, las velocidades de producción de los diferentes componentes del sistema, en las dos etapas comentadas, responderán a los siguientes sistemas de ecuaciones diferenciales:

PRIMERA ETAPA: $G \neq 0$

$$\text{Biomasa: } \frac{dC_X}{dt} = +r_1 \quad (\text{Eq. 16})$$

$$\text{Glucosa: } \frac{dC_G}{dt} = -\nu_{G,X} \cdot r_1 \quad (\text{Eq. 17})$$

$$\text{Fructosa+Galactosa: } \frac{dC_{F+Gal}}{dt} = 0 \quad (\text{Eq. 18})$$

$$\text{Ácido D-láctico: } \frac{dC_P}{dt} = +\nu_{P,X} \cdot r_1 \quad (\text{Eq. 19})$$

SEGUNDA ETAPA: $G = 0$

$$\text{Biomasa: } \frac{dC_X}{dt} = 0 \quad (\text{Eq. 20})$$

$$\text{Glucosa: } \frac{dC_G}{dt} = 0 \quad (\text{Eq. 21})$$

$$\text{Fructosa: } \frac{dC_{F+Gal}}{dt} = -\nu_{F+Gal,P} \cdot r_2 \quad (\text{Eq. 22})$$

$$\text{Ácido D-láctico: } \frac{dC_P}{dt} = +r_2 \quad (\text{Eq. 23})$$

Se ha ajustado el modelo recogido en las ecuaciones 16 a 23, a los datos obtenidos en el estudio de la influencia de la temperatura y el pH en la etapa de fermentación (empleando como medio MRS suplementado con la mezcla de azúcares que corresponde a la composición del hidrolizado de residuos de naranja obtenido en operación discontinua) con las células en estado de crecimiento, empleando el software *Aspen Custom Modeller*. En las Figuras 1 y 2 de la Publicación 4 recogida en el Anexo, se muestra que el modelo cinético propuesto es capaz de reproducir muy bien la evolución de la glucosa, la fructosa y la galactosa, de la biomasa y del ácido D-láctico; mostrando unos parámetros estadísticos muy representativos (ver Tabla 2, Publicación

4). Debido a que los datos experimentales obtenidos empleando el residuo hidrolizado, inicialmente suplementando el medio MRS, son muy similares a los observados cuando se emplea la mezcla de azúcares modelo (como se ha mostrado anteriormente), en la **Figura 27**, se observa que el modelo cinético propuesto (con los valores de los parámetros comentados) proporciona una muy buena predicción de la evolución de todos los componentes del proceso también para el caso del experimento control.

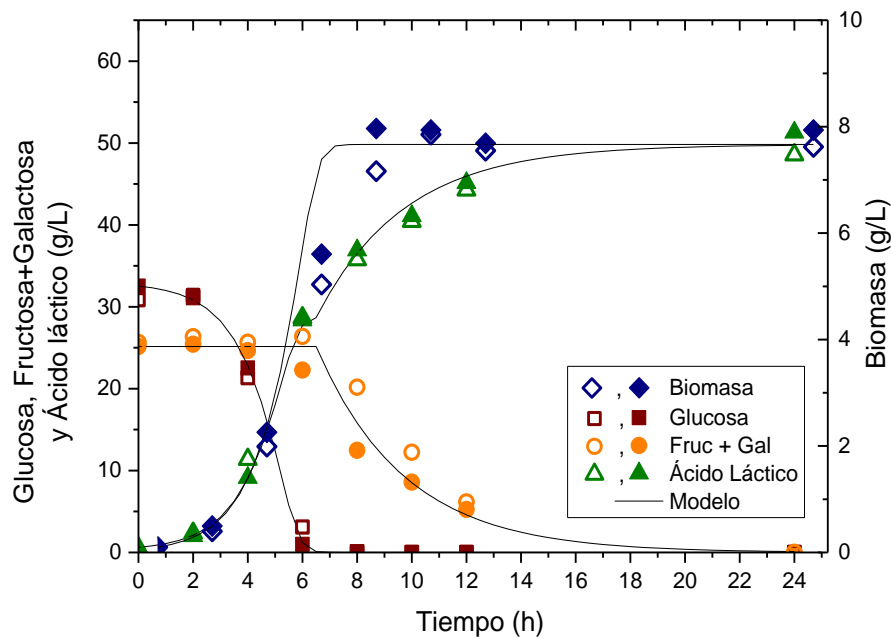


Figura 27. Ajuste del modelo propuesto a los resultados obtenidos con células en estado de crecimiento empleando el medio modelo (símbolos cerrados) y con el hidrolizado de naranja obtenido en operación discontinua (símbolos abiertos), ambos suplementados con medio MRS.

También se llevó a cabo el ajuste del modelo propuesto a los experimentos realizados con un medio de cultivo formado únicamente por la fuente de nitrógeno determinada como óptima (37 g/L de *corn steep liquor*) y el hidrolizado del residuo de naranja obtenido en operación discontinua. Los resultados del ajuste se pueden ver en la **Figura 28**, donde se observa la buena reproducción obtenida de los datos experimentales. Los valores de los parámetros del modelo, así como los de los parámetros estadísticos de ajuste se encuentran recogidos en la Publicación 4, del Anexo.

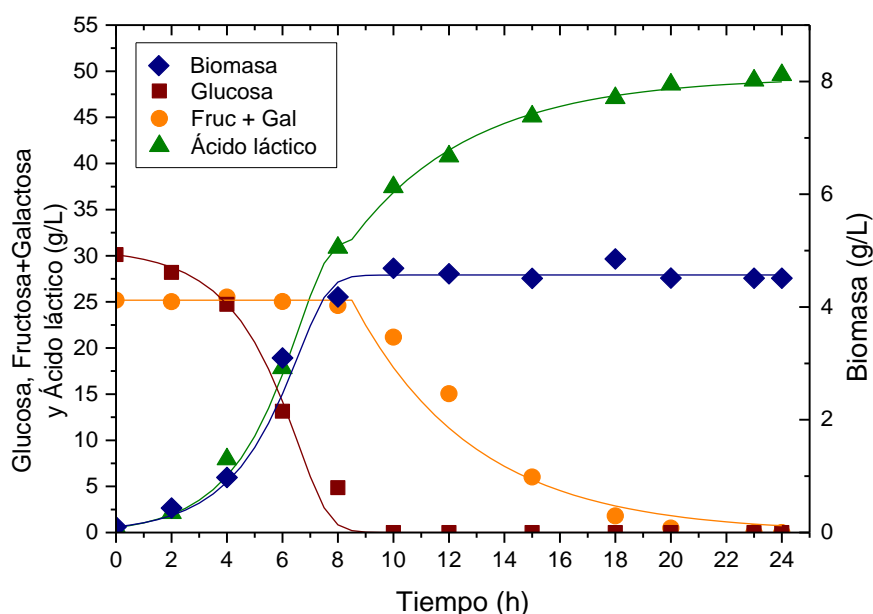


Figura 28. Resultados del ajuste llevado a cabo para el experimento realizado con residuo de naranja hidrolizado en operación discontinua suplementado con corn steep liquor y células en estado de crecimiento.

Posteriormente, se aplicó el modelo a los experimentos realizados con **células en estado de crecimiento** y empleando el residuo hidrolizado (suplementado con CSL) obtenido en operación *fed-batch* (en los que se utilizó el citado residuo tanto sin diluir como diluido al 80 %; y el experimento control realizado con el medio modelo para este residuo -resultados recogidos en la Publicación 3 del Anexo-). En la **Figura 29** se muestra la buena predicción que el modelo es capaz de hacer en los tres casos para todos los componentes del sistema.

Por otra parte, en la **Tabla 23** se recogen los valores de los parámetros del modelo obtenidos por ajuste a los datos de estos experimentos (columnas bajo el epígrafe de células en estado de crecimiento). Como cabía esperar, tras la observación de las evoluciones de los diferentes compuestos, se observa que la velocidad específica de crecimiento (μ_m) en los casos en los que se emplean concentraciones más elevadas de monosacáridos (medio modelo e hidrolizado), su valor es prácticamente el mismo (considerando el intervalo de error del ajuste); sin embargo, al disminuir sus concentraciones por dilución, el valor de este parámetro aumenta, lo que podría indicar la presencia de inhibición por altas concentraciones de sustrato. En el resto de parámetros cinéticos se puede observar que no existe diferencia significativa entre

ellos. En cuanto a los valores de los parámetros estequiométricos (en realidad se trata de los rendimientos macroscópicos, que dan una idea de los flujos de carbono en el proceso) relativos a la primera etapa del proceso en la que se produce el crecimiento celular a partir de la glucosa (v_{GX} y v_{PX}), de nuevo se puede observar que, en los experimentos de mayor concentración de monosacáridos, los valores son muy parecidos dentro del error del ajuste, sin embargo, cuando se emplea la concentración menor en estos azúcares, ambos parámetros presentan valores algo menores. Sin embargo, si se determina el valor del rendimiento de la glucosa para la formación de ácido D-láctico que predice el modelo (como el cociente entre ambos coeficientes, según la ecuación 24), se obtiene, para todos los casos un valor alrededor de 0,8. Por otra parte es destacable, que el coeficiente relacionado con la producción del ácido láctico en la segunda etapa, es decir, a partir de fructosa y galactosa, presenta siempre el mismo valor, cercano a la unidad.

$$Y_{PG} \left(\frac{g_P}{g_P} \right) = \frac{v_{PX}}{v_{GX}} \quad (\text{Eq. 24})$$

Tabla 22. Valores de los parámetros del modelo cinético obtenidos por ajuste a los datos de los experimentos llevados a cabo con medio modelo y residuo de naranja hidrolizado obtenido en operación fed-batch (con y son dilución); tanto para el caso del empleo de células en estado de crecimiento como de resting.

PARÁMETRO	CÉLULAS EN ESTADO DE CRECIMIENTO (CON 37 G/L CSL)			CÉLULAS EN ESTADO DE RESTING	
	MEDIO MODELO	HIDROLIZADO		HIDROLIZADO	
		100 %	80 %	100 %	80 %
μ_m (h ⁻¹)	0,68 ± 0,04	0,56 ± 0,05	0,82 ± 0,03	0,12 ± 0,08	0,17 ± 0,05
K_S (g/L)	50,7 ± 5,9	49,9 ± 9,0	50,1 ± 3,6	48,6 ± 7,3	47,5 ± 4,5
K_P (gP.L)/(gF+G.gX.h)	(10,0 ± 2,0).10 ⁻³	(11,0 ± 2,0).10 ⁻³	(12,0 ± 2,0).10 ⁻³	(4,1 ± 0,2).10 ⁻³	(16,0 ± 3,0).10 ⁻³
$v_{P,X}$ (gP/gX)	11,5 ± 2,1	9,2 ± 1,4	7,9 ± 1,0	11,0 ± 1,2	10,5 ± 0,8
$v_{G,X}$ (gG/gX)	14,4 ± 2,3	12,0 ± 1,4	9,9 ± 1,0	11,6 ± 1,1	12,7 ± 0,4
v_{F+GLP} (gF+G/gP)	1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,2

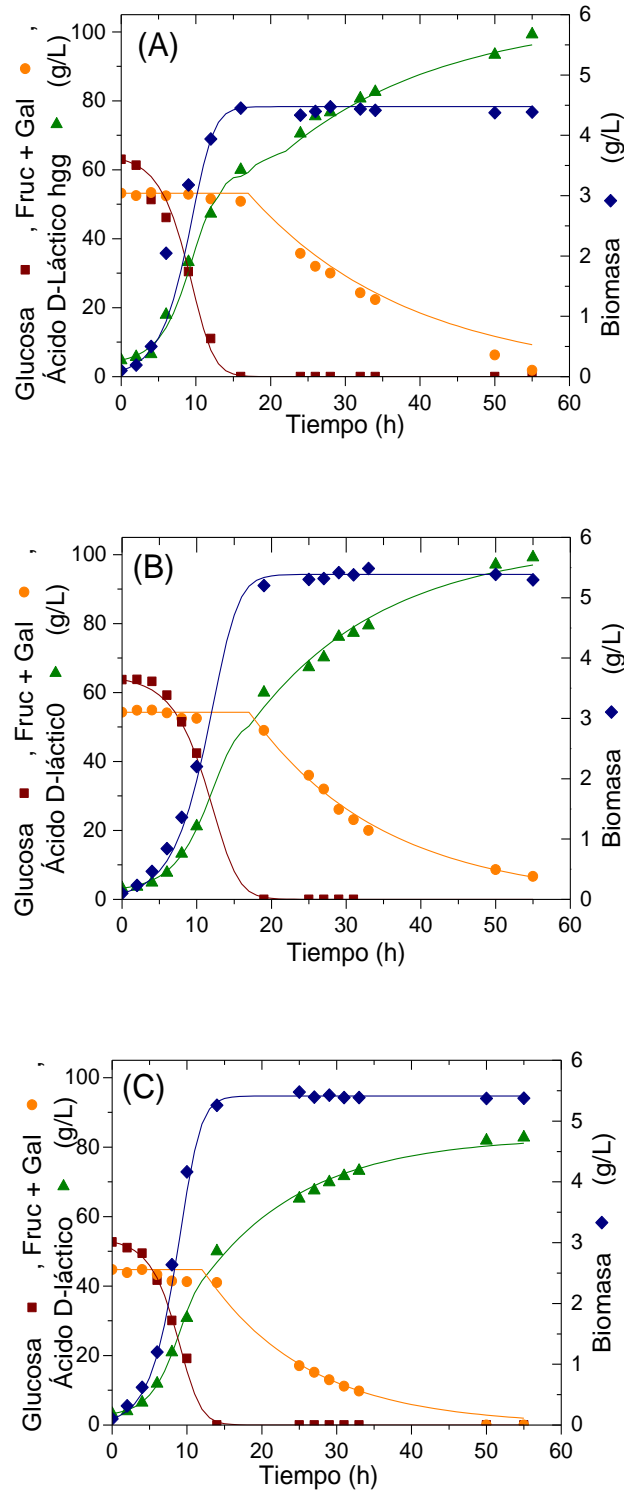


Figura 29. Resultados del ajuste del modelo a los experimentos realizados con células en estado de crecimiento, empleando residuo de naranja hidrolizado obtenido en operación fed-batch suplementado con corn steep liquor: medio modelo (A), hidrolizado (B), hidrolizado diluido al 80 % (C).

Finalmente, se llevó a cabo el ajuste del modelo (ecuaciones 13 a 20) a los datos experimentales obtenidos sin complementar con CSL el hidrolizado del residuo

obtenido en operación *fed-batch* (con y sin dilución), tratando de emplear **células en estado de *resting cells***, resultados que se recogen en la Publicación 3 del Anexo. Como se ha comentado en el apartado anterior de la presente Memoria, en estos experimentos, debido al contenido de proteínas del residuo, se produce un crecimiento de la biomasa; por lo tanto, es aplicable el mismo modelo propuesto y aplicado a los experimentos llevados a cabo con células en estado de crecimiento. En la **Figura 30** se muestra la buena reproducción de los datos experimentales obtenida. Los valores de los parámetros del modelo determinados por ajuste estadístico para estos experimentos se recogen en la **Tabla 23** (columnas con el epígrafe de células en estado de *resting*), donde se puede observar que no existen diferencias entre los valores obtenidos para ambos experimentos, a excepción de la constante cinética de la reacción de transformación de fructosa y galactosa en ácido D-láctico (k_p), que muestra un valor muy superior en el caso del empleo del residuo hidrolizado diluido al 80 %, lo que indica el efecto inhibitorio que provocan la elevada concentración de estos monosacáridos cuando la disponibilidad de fuente de nitrógeno en el medio es escasa. En este caso, si se determina el valor del rendimiento de la glucosa para la formación de ácido D-láctico que predice el modelo (según la ecuación 24), se obtienen siempre valores mayores que en el caso de emplear células en estado de crecimiento.

En la **Tabla 23** se han recogido, de forma comparativa, los valores de todos los parámetros obtenidos por ajuste del modelo a los datos experimentales, tanto empleando células en estado de crecimiento como en estado de *resting cells*. En primer lugar, es destacable que los valores obtenidos en presencia y ausencia de CSL son, en general, bastante parecidos. Asimismo, cabe destacar que los experimentos realizados sin adición de CSL presentan valores menores de la velocidad específica de crecimiento, seguramente debido a la menor disponibilidad de compuestos nitrogenados en el medio de cultivo. Por otra parte, el efecto de la inhibición debido a la fructosa y la galactosa (recogido en el valor del parámetro k_p) es más patente también en el caso de no suplementar el residuo hidrolizado con CSL, es decir, con células en estado de *resting*: con concentraciones elevadas de los monosacáridos la velocidad es mucho menor (hidrolizado al 100 % en la Tabla), obteniendo un valor del parámetro mucho mayor (aunque dentro del mismo intervalo que empleando células en estado de crecimiento) cuando las concentraciones de esos monosacáridos y de los compuestos tóxicos, se reducen mediante la dilución del hidrolizado.

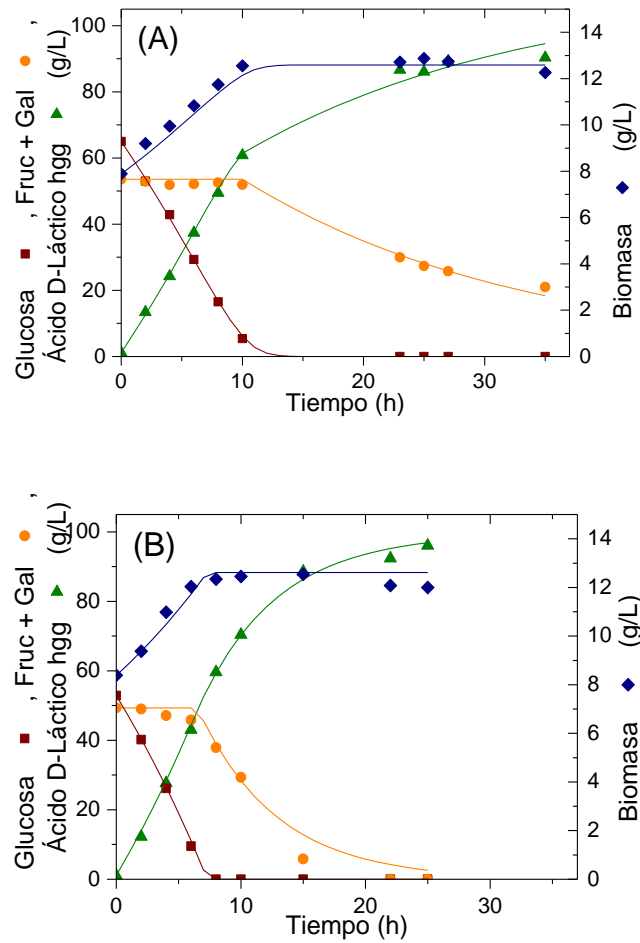


Figura 30. Resultados del ajuste del modelo a los experimentos realizados con células en estado de resting, empleando residuo de naranja hidrolizado obtenido en operación fed-batch: hidrolizado (A), hidrolizado diluido al 80% (B).

Por último, es necesario destacar que el modelo propuesto, dentro de su enorme sencillez, es capaz de describir el comportamiento cinético de las transformaciones de este proceso de producción de ácido D-láctico, en aquellas condiciones estudiadas en las que hay crecimiento del microorganismo

4. Abreviaturas y Nomenclatura

4.1. Abreviaturas

CSL	Corn steep liquor (residuo líquido del procesado del maíz)
FPU	<i>Filter paper unit</i> (unidades de papel de filtro)
FRU	Fructosa
GAL	Galactosa
GLU	Glucosa
ME	<i>Meat extract</i> (extracto de carne)
PEP	Peptona
PTS	<i>Phosphotransferase system</i> (sistema fosfotransferasa)
STBR	<i>Stirred tank bioreactor</i> (biorreactor de tipo tanque agitado)
X	Biomasa
YE	<i>Yeast extract</i> (extracto de levadura)

4.2. Nomenclatura

a_r	Actividad enzimática remanente o residual (adimensional)
C_j	Concentración del compuesto j (g _j /L)
E_a	Energía de activación (J/mol).
h	Parámetro fractal (adimensional)
k	Constante cinética del modelo fractal (h ⁻¹)
k_d	Constante de desactivación (h ⁻¹)
k_{d0}	Factor pre-exponencial de la ecuación de Arrhenius para la constante k _d (h ⁻¹).
k_i	Constante aparente (h ⁻¹)
k_p	Constante cinética de la reacción de producción de ácido D-láctico a partir de fructosa y galactosa (g _p .L/g _{F+Gal} .g _X .h)
K_s	Constante del modelo de Monod (g _G /L)

k₀	Factor pre-exponencial de la ecuación de Arrhenius (h^{-1})
N	Velocidad de agitación (rpm)
P	Productividad del ácido D-láctico ($\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$)
R	Rendimiento de ácido láctico referido a la concentración inicial total de sustratos (%)
r_i	Velocidad de la reacción i ($\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$)
R_j	Velocidad de producción del compuesto “j” ($\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$)
S	Selectividad del ácido D-láctico (g/g)
t	Tiempo (h)
VE	Variación explicada de los datos experimentales mediante el ajuste estadístico del modelo (%)
Y	Rendimiento en glucosa o ácido galacturónico durante la hidrólisis enzimática del residuo de naranja (%) (ecuación 10)
Y_{P,G}	Rendimiento en ácido D-láctico durante la fermentación, en la reacción de consumo de glucosa ($\text{g}_\text{p}/\text{g}_\text{G}$)

Letras Griegas

β	Porcentaje de actividad enzimática a tiempo final (actividad residual a tiempo infinito) (%)
μ_m	Velocidad específica máxima de crecimiento en la ecuación de Monod (h^{-1})
$v_{j,i}$	Parámetro estequiométrico ($\text{g}_\text{j}/\text{g}_\text{i}$)

Subíndices

F	Referido a fructosa
G	Referido a glucosa
Gal	Referido a galactosa
P	Referido al producto de la fermentación (ácido D-láctico)
X	Referido a la biomasa



CONCLUSIONES CONCLUSIONS

CONCLUSIONES

A lo largo del desarrollo experimental y la modelización que se recogen en esta Memoria, se han extraído diferentes conclusiones para cada una de las etapas estudiadas: hidrólisis enzimática y fermentación, operando con células en estado de crecimiento y de *resting*. A continuación, se detallan las conclusiones más importantes del trabajo realizado. En el Anexo de esta Memoria, donde se incluyen las diferentes publicaciones que recogen los resultados de este trabajo, se pueden encontrar las conclusiones obtenidas para cada uno de los artículos científicos publicados.

1. Optimización de la Hidrólisis enzimática

Condiciones de operación.

- a. Las mejores condiciones de hidrólisis enzimática de los residuos de naranja son 50 °C, 300 rpm y un control de pH a un valor de 5,2 al inicio de la reacción y transcurridos los primeros cinco minutos.
- b. Para determinar la concentración de enzima a emplear, se debe llegar a un compromiso entre la concentración de azúcares obtenida y la concentración de enzima empleada
- c. Trabajando al 6,7 % p/p de residuo de naranja al 80 % de humedad, la concentración de azúcares obtenida es demasiado baja para ser competitiva en un proceso industrial, aunque los rendimientos son cercanos al 100 %
- d. Al trabajar a un elevado contenido en sólido seco, del 10,1 % p/p de residuo de naranja al 80% de humedad, se consigue incrementar la concentración final de azúcares.

Estrategias para incrementar los azúcares

- e. Secar el residuo de naranja lleva al incremento de la concentración de azúcares finales, aunque se reducen los rendimientos
- f. Operar en *fed-batch* incrementa la concentración de azúcares obtenida y permite reutilizar las enzimas, reduciendo la cantidad de coctel enzimático a añadir al medio de sacarificación.

Efecto de las condiciones de operación en la actividad enzimática

- g. Las enzimas presentan una mayor velocidad inicial de liberación de glucosa a altas temperaturas.
- h. La exposición de las enzimas a altas temperaturas, por encima de 50 °C, conlleva la desactivación de las mismas
- i. Las enzimas se desactivan al ser sometidas a velocidades de agitación elevadas

Proceso mejorado

- j. Trabajando al 10,1% p/p de residuo de naranja al 80% de humedad con lo que se consigue incrementar la concentración final de azúcares. La concentración óptima es: 12 $\mu\text{L/g}$ de Celluclast 1.5L, 13.7 $\mu\text{L/g}$ de Novozyme 188 y 10.2 $\mu\text{L/g}$ de Pectinex Ultra SP. En estas condiciones se obtiene un rendimiento del 80 % y 59,7 g/L de azúcares totales (30,6 g/L de glucosa, 22,1 g/L de fructosa, 2,6 g/L de galactosa y 4,4 g/L de arabinosa).
- k. Operar en *fed-batch* con 5 cargas empleando residuo seco al 60% permite reducir la cantidad de enzima empleada a 0,6 $\mu\text{L/g}$ de Celluclast 1.5L, 0,7 $\mu\text{L/g}$ de Novozyme 188 y 0,4 $\mu\text{L/g}$ de Pectinex Ultra SP (cantidad adicionada por gramo de sólido final) además de incrementar la concentración de azúcares totales a 120 g/L (60 g/L de glucosa, 40 g/L de fructosa, 9 g/L de galactosa y 8 g/L de arabinosa), con un rendimiento de sacarificación algo superior al 50 %.
- l. La evolución de las concentraciones de glucosa y ácido galacturónico se puede reflejar en un modelo cinético de primer orden de tipo fractal que contiene ecuaciones para la desactivación parcial de orden 1 para las glucanasas y la β -glucosidasa y total de orden 1 para la pectinasa.

2. Optimización de la Fermentación

- a. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* CECT286 es una cepa capaz de producir el isómero D- del ácido láctico a partir de la mezcla de azúcares presentes en el hidrolizado de naranja, sin la presencia de otros subproductos.

- b. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* CECT286 no consume arabinosa, que corresponde a un 6-10 % de los azúcares totales del hidrolizado del residuo de naranja.

2.1. Empleo de células en estado de crecimiento

Condiciones de operación y medio de cultivo

- c. Las condiciones de operación a las que la producción de ácido D-láctico es máxima son 40 °C, pH controlado a 5,8 y 200 rpm
- d. La producción se puede llevar a cabo empleando 37 g/L de CSL como fuente de nitrógeno, consiguiendo una considerable reducción en los costes respecto al medio empleado habitualmente en la literatura.

Efecto del empleo del hidrolizado de residuo de naranja

- e. El empleo del residuo hidrolizado, obtenido en operación discontinua, proporciona muy buenos resultados de producción, similares a los obtenidos con un medio modelo: 41 g/L de ácido D- láctico, rendimiento de 88 % y productividad de 2,4 g/(L·h) .

Efecto de la concentración en monosacáridos

- f. La elevada concentración en monosacáridos obtenida en la hidrólisis en operación en *fed-batch* produce inhibición por sustrato en el proceso, siendo necesaria su dilución (en este trabajo se ha hecho al 80 % de la concentración inicial)
- g. El aumento de concentración en azúcares del residuo hidrolizado (obtenido en operación *fed-batch* y diluido) proporciona concentraciones máximas de ácido D-láctico de 83 g/L, lo que supone un rendimiento de 83 % y una productividad de 1,6 g/(L·h).
- h. La presencia de posibles compuestos tóxicos para el microorganismo provenientes de la etapa de hidrólisis del residuo de naranja queda patente cuando se emplea el hidrolizado del residuo sin diluir.

2.2. Empleo de células en estado de *resting*

Condiciones de operación y medio de cultivo

- i. Las condiciones de operación, a las que la producción de ácido D-láctico es máxima, son 40 °C, pH controlado a 5,8, concentración de biomasa de 10 g/L y 800 rpm.

Etapas de producción del biocatalizador

- j. Es necesario adaptar el cultivo para el consumo de fructosa durante la etapa de producción de la biomasa.

Efecto del residuo de naranja hidrolizado

- k. El microorganismo es capaz de crecer empleando el residuo hidrolizado debido a la presencia de compuestos nitrogenados.
- l. El crecimiento de la biomasa durante la etapa de producción de ácido D-láctico mejora la productividad del proceso frente al empleo de un medio modelo.
- m. El empleo del residuo hidrolizado, obtenido en operación discontinua, proporciona muy buenos resultados de producción: 48 g/L de ácido D-láctico, rendimiento de 88 % y productividad de 6,7 g/(L·h); siendo este valor bastante superior a los recogidos en la literatura.

Efecto de la concentración en monosacáridos

- n. La elevada concentración en monosacáridos obtenida en la hidrólisis en operación en *fed-batch* produce inhibición por sustrato en el proceso, siendo necesaria su dilución (en este trabajo se ha hecho al 80 % de la concentración inicial)
- o. El aumento de concentración en azúcares del residuo hidrolizado (obtenido en operación *fed-batch* y diluido) proporciona concentraciones máximas de ácido D-láctico de 81 g/L de ácido láctico, un rendimiento de 90 % y una productividad de 3,7 g/(L·h).
- p. La presencia de posibles compuestos tóxicos para el microorganismo provenientes de la etapa de hidrólisis del residuo de naranja queda claramente patente cuando se emplea el hidrolizado del residuo sin diluir.

2.3. Modelización cinética

- q. El proceso de producción de ácido D-láctico a partir de hidrolizados de naranja responde, tanto empleando células en estado de crecimiento como de *resting*, a un mismo patrón de comportamiento:
 - La glucosa es el nutriente limitante del crecimiento
 - Se lleva a cabo producción de ácido D-láctico asociada al crecimiento.
 - La fructosa y la galactosa se emplean únicamente para la producción de ácido D-láctico, cuando se agota la glucosa en el medio, de forma no asociada al crecimiento.
- r. El modelo cinético propuesto es capaz de explicar todos los resultados experimentales obtenidos en este trabajo en los que hay crecimiento.
- s. El ajuste estadístico del modelo cinético propuesto a los datos experimentales obtenidos en el presente trabajo es excelente.

CONCLUSIONS

The development of this experimental work has provided some conclusions for each stage studied: enzymatic hydrolysis and fermentation, including working with growing and resting cells. The most important conclusions are included in this section. In Annex of this document, the main conclusions obtained for each published research can also be found

1. Enzymatic hydrolysis stage

Operational conditions

- a. The optimum operational conditions to carry out the hydrolysis step are 50 ° C, 300 rpm and pH control at 5.2 adjusted before adding the enzyme and after the first 5 minutes.
- b. To determine the concentration of enzyme to be used, an agreement must be reached between the final concentration of sugars and the concentration of enzyme used, since this determines the economy of the process.
- c. If the process is carried out at 6.7 % of dry solid with an orange waste with 80% humidity, the final sugars obtained are too low to be economically feasible, although the yields are close to 100 %.
- d. If the process is carried out at 10.1 % of dry solid with an orange residue with 80 % humidity, the final concentration of sugars is increased.

Ways to increase the sugars concentration

- e. An increase in final sugars is obtained when the orange waste is partially dried.
- f. An increase in the final sugars is obtained when the process is carried out in fed-batch. It also allows the enzyme to be reused and reduced the amount employed.

Effect of operational conditions in activity of enzymes

- g. Enzymes have a high initial rate in the glucose released when temperatures are high.

- h. Enzymatic deactivation is observed when the enzymes are subjected to high temperatures over time.
- i. Enzymatic deactivation is observed when the enzymes are subjected to high agitations over time.

Optimum process

- j. An increased of final sugars is obtained when the process is carried out at 10.1 % of dry solid with an orange waste with 80 % water. The optimum concentration of enzyme is 12 $\mu\text{L/g}$ de Celluclast 1.5L, 13.7 $\mu\text{L/g}$ de Novozyme 188 y 10.2 $\mu\text{L/g}$ de Pectinex Ultra SP. In this condition, a yield of 80 % and 59.7 g/L of end total sugars (30.6 g/L of glucose, 22.1 g/L of fructose, 2.6 g/L of galactose and 4.4 g/L of arabinose are obtained.
- k. The enzyme can be reduced when the process is carried out in fed-batch mode with 5 feeds at 0.6 $\mu\text{L/g}$ of Celluclast 1.5L, 0.7 $\mu\text{L/g}$ of Novozyme 188 and 0.4 $\mu\text{L/g}$ of Pectinex Ultra SP-L (amount added by gram of end dry solid). An increased of sugars is also obtained at 120 g/L of total sugars (60 g/L of glucose, 40 g/L of fructose, 9 g/L of galactose and 8 g/L of arabinose. The saccharification yield obtained in these conditions is slightly over 50 %.
- l. The temporal evolution of glucose and galacturonic acid concentration can be represented by a first-order kinetic model of the fractal type containing an equation for partial first order deactivation of the cellulase complex and an equation of total first order deactivation for the pectinases.

2. Fermentation stage

- a. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* CECT286 is able to produce the D- isomer of the lactic acid from the monosaccharides mixture in the hydrolyzed orange peel waste (HOPW), with no by-products.
- b. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* CECT286 cannot uptake arabinose, (6-10 % total sugars from the HOPW).

2.1. Fermentation using growing cells

Operational conditions and culture medium

- c. Maximum D-Lactic acid production reached at 40 °C, pH controlled at 5.8 and 200 rpm
- d. 37 g/L de CSL can be used as nitrogen source yielding a very high reduction on costs when compared to the culture medium usually used on literature.

Hydrolyzed Orange Peel Waste Effect

- e. When HOPW (obtained in batch mode) is used for fermentation, very close results are obtained compared to those ones from a model medium: 41 g/L D-lactic acid, D-LA yield up to 88 % at a productivity of 2.4 g/(L·h).

Monosaccharides concentration Effect

- f. The very high concentration of monosaccharides obtained from a fed-batch hydrolysis provokes process inhibition, being necessary to be diluted (in this work to the 80 % of the HOPW)
- g. The use of higher monosaccharides concentration (from a fed-batch hydrolysis operation and a further dilution) provides 83 g/L D-lactic acid, 83 % yield and 1.6 g/(L·h) productivity.
- h. Toxic compounds from the orange peel waste hydrolysate affect microorganism metabolism, being clearly observed when diluted HOPW is used.

2.2. Fermentation using resting cells

Operational conditions and culture medium

- i. Maximum D-Lactic acid production reached at 40 °C, pH controlled at 5.8, 10 g/L biomass concentration and 800 rpm (bioreactor).

Biocatalyst production stage

- j. To adapt the microorganism to fructose uptake, this stage is necessary.

Hydrolyzed Orange Peel Waste Effect

- k. Growth is observed due to the nitrogen compounds from the HOPW.
- l. Growth positively affects the D-lactic acid production stage compared to the use of a model medium.
- m. When HOPW (obtained in batch mode) is used for fermentation, very good results are obtained: 48 g/L D-lactic acid; 88 % yield and 6.7 g/(L·h) productivity; this is the highest value observed so far in the literature

Monosaccharides concentration Effect

- n. The very high concentration of monosaccharides obtained from a fed-batch hydrolysis provokes process inhibition, being necessary to be diluted (in this work to the 80 % of the HOPW)
- o. The use of higher monosaccharides concentration (from a fed-batch hydrolysis operation and a further dilution) provides 81 g/L D-lactic acid, 90 % yield and 3.7 g/(L·h) productivity.
- p. Toxic compounds from the orange peel waste hydrolysate highly affect microorganism metabolism, being clearly observed when diluted HOPW is used.

2.3. Kinetic Modelling

- q. The production of D-lactic acid responds to the same behavior pattern, both for growing and resting cells:
 - Glucose is the growth limiting nutrient of the process.
 - Associated growth D-lactic acid production is observed
 - Fructose and Galactose are used only for non-growth associated D-lactic acid production.
- r. The proposed kinetic model is able to explain all the experimental results performed in this document in which growth is observed.
- s. Statistics from the fit of the kinetic model to the experimental data are excellent.

The background of the page is a close-up photograph of several ripe, bright orange fruits. Interspersed among the oranges are green leaves and clusters of small, white, five-petaled orange blossoms. The lighting is soft, highlighting the texture of the orange peels and the delicate structure of the flowers.

ANEXO: PUBLICACIONES

PUBLICACIÓN 1

Autores: Isabel de la Torre, Víctor Martín, Miguel G. Acedos, Jesús Esteban, Victoria E. Santos y Miguel Ladero.

Título: Utilization/upgrading of Orange Peel Waste from a biological biorefinery perspective.

Revista: Applied Microbiology and Biotechnology (2019)

Índice de Impacto (2018): 3,670

Categoría: Biotecnología y Microbiología Aplicada.

Enlace: <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09929-2>

Resumen:

Los residuos de naranja incluyen la piel, pulpa y semillas y proviene principalmente de la industria de zumos de naranja. La revalorización de este tipo de residuos ha ido destinado a la alimentación de ganado y compostaje, lo que no asegura un aprovechamiento íntegro del residuo, o bien este tipo de residuos van destinados a vertederos lo que conlleva importantes problemas sanitarios y contaminación de ecosistemas. Debido a la composición en azúcares y polisacáridos de estos residuos, la literatura se ha centrado en el desarrollo y optimización de procesos para la obtención de nuevos productos a partir de estos residuos. Esta revisión se centra en diferentes bioprocesos propuestos en literatura para la obtención de productos de alto valor añadido como biogás, bioetanol, saborizantes o polímeros, entre otros, a partir de los residuos de naranja. Además, incluye las diferentes tecnologías desarrolladas para la integración de estos procesos en el marco de las biorrefinerías de segunda generación.



Utilisation/upgrading of orange peel waste from a biological biorefinery perspective

I. de la Torre¹ · V. Martin-Dominguez¹ · M. G. Acedos¹ · J. Esteban² · V. E. Santos¹ · M. Ladero¹ 

Received: 27 February 2019 / Revised: 16 May 2019 / Accepted: 18 May 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

Orange peel waste (OPW) (peels, pulp and seeds) is an underutilised residue coming from the orange juice industry. Its classical applications are cattle feeding and composting, while they cannot ensure a total use of OPW, so landfilling is also common practice. On the other side, OPW is very rich in sugars, polysaccharides, essential oils and polyphenols, so there is a vast literature focused on the development and optimization of technologies and processes to several products from OPW. In this review, papers on OPW-based bioprocesses are visited, discovering a wide landscape that goes from the composting and biogas processes on detoxified OPW (deoiled) to bioprocesses to bioethanol, chemicals, flavours and polymers. All these processes are prone to integration within the 2nd-generation biorefinery framework.

Keywords Orange peel waste · Bioprocess · Biorefinery · Chemicals · Energy vectors

Introduction

In 2017, 73.31 MT of oranges was produced, according to FAO (FAOstat 2018), being the most abundant fruit crop in the world. The main world producers of this fruit are Brazil, China and the USA, producing shares of 21.4%, 10.5% and 8.02% of the global production, respectively (FAOstat 2018). Of such enormous amounts of this citric, about 18.46 MT is used for the manufacture of juice and marmalades. The liquid and solid waste mass created during the industrial processing amounts to approximately half of the orange weight. Orange peel waste (OPW) contains a large amount of moisture (80–90% w/w of water content) and has a great organic load (Rezzadori et al. 2012).

The orange peel structure consists of an external coloured surface referred to as flavedo and an inner white spongy structure named albedo. The flavedo contains the bags with essential oils (EO), mostly composed by limonene, whereas the albedo has a foamy structure and features a high content of

pectin. For its part, the fruit is covered by a skin-like tissue called endocarp, which is composed of pulp and juice, where there are also membranes to delimit each of the segments. OPW, i.e., the part that is thrown away after juice manufacturing, includes pulp and membranes from the aforementioned endocarp, albedo and flavedo (Arevalo-Gallegos et al. 2017).

The composition of this waste is rich in structural polysaccharides and related polymers, including cellulose (18–20% w/w based on dry solid (DS)), hemicellulose (14–16% w/w DS), pectin (20–22% w/w DS) and lignin (5–7% w/w DS). It is also abundant in free sugars, namely, glucose, fructose and sucrose (about 30–36% w/w DS), as well as other components such as EO (0.3–0.5% w/w DS) and proteins (up to 8% w/w DS) (De la Torre et al. 2017), the peel being particularly plentiful in pectin (up to 42–43% w/w DS) (Rivas et al. 2008). It has been determined that 1 kg of OPW contain 233 g of dry solid, and this dry solid contains 975 g of organic matter per kg of dry solid with a high content in different acids that results in a waste with a pH of 3.64.

OPW shows great potential for valorisation within the biorefinery strategy due to its rich composition in organic compounds as well as the burgeoning problems generated by their disposal (Fiorentino et al. 2017; Isikgor and Becer 2015; Van Dyk and Pletschke 2012).

The main destination of these residues is cattle feed, composting, incineration or dump storage (Coma et al. 2017). The former is the most extended application of OPW,

✉ M. Ladero
mladerog@ucm.es

¹ Materials and Chemical Engineering Department, Chemical Sciences School, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain

² Max Planck Institute for Chemical Energy Conversion, Stiftstraße 34-36, 45740 Mülheim an der Ruhr, Germany

- Velasco D, Senit JJ, de la Torre I, Santos TM, Yustos P, Santos VE, Ladero M (2017) Optimization of the enzymatic saccharification process of milled orange wastes. *Fermentation* 3(3):37
- Werpy T, Petersen G, Aden A, Bozell J, Holladay J, White J, Manheim A (2004) Top value added chemicals from biomass. Volume 1-Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas (no. DOE/GO-102004-1992). Department of Energy Washington DC
- Widmer W, Zhou W, Grohmann K (2010) Pretreatment effects on orange processing waste for making ethanol by simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresour Technol* 101(14):5242–5249
- Wikandari R, Nguyen H, Millati R, Niklasson C, Taherzadeh MJ (2015) Improvement of biogas production from orange peel waste by leaching of limonene. *BioMed Res Int*
- Wilkins MR, Suryawati L, Maness NO, Chrz D (2007) Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* in the presence of orange-peel oil. *World J Microbiol Biotechnol* 23(8): 1161–1168
- Xhaxhiu K, Wenclawiak B (2015) Comparison of supercritical CO₂ and ultrasonic extraction of orange peel essential oil from Albanian moro cultivars. *J Essent Oil Bear Plants* 18(2):289–299
- Yang P, Wu Y, Zheng Z, Cao L, Zhu X, Mu D, Jiang S (2018) CRISPR-Cas9 approach constructing cellulase secrete-engineered *Saccharomyces cerevisiae* for the production of orange peel ethanol. *Front Microbiol* 9:2436
- Zema DA, Fòlino A, Zappia G, Calabrò PS, Tamburino V, Zimbone SM (2018) Anaerobic digestion of orange peel in a semi-continuous pilot plant: an environmentally sound way of citrus waste management in agro-ecosystems. *Sci Total Environ* 630:401–408
- Zhou YM, Chen YP, Guo JS, Shen Y, Yan P, Yang JX (2018) Recycling of orange waste for single cell protein production and the synergistic and antagonistic effects on production quality. *J Clean Prod* 213: 384–392

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

PUBLICACIÓN 2

Autores: Isabel de la Torre, Marianela Ravelo, Silvia Segarra, Marta Tortajada, Victoria E. Santos y Miguel Ladero.

Título: Study on the effects of several operational variables on the enzymatic batch saccharification of orange solid waste.

Revista: Bioresource Technology 245 (2017) 906–915

Índice de Impacto (2017): 5,807

Categoría: Ingeniería agrícola, biotecnología y microbiología aplicada, combustibles y energía.

Enlace: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.094>Get

Resumen:

En este trabajo se lleva a cabo el estudio del proceso de hidrólisis enzimática de residuos de naranja molida. Para ello, se analizó el efecto de distintas variables (pH, temperatura, agitación y concentración de enzima), obteniendo los mejores resultados operando en las siguientes condiciones: ajustando el pH a 5,2 durante los primeros 5 minutos, 50 °C y 300 rpm, y con una desactivación total y parcial de primero orden de la enzima (para celulasas y poligalacturonasas, respectivamente). Alrededor de 40 g/L de azúcares y 80 % de rendimiento en glucosa se obtiene trabajando en las condiciones mencionadas, 6,7 % de sólido seco y 0,22 *filter paper units* (FPU)/g y junto a otras enzimas. Esta concentración se puede incrementar a 50 g/L y un 63 % de rendimiento en glucosa trabajando en las mismas condiciones e incrementando el porcentaje de sólido seco de 6,7 a 10,1 %. Otra forma de poder incrementar la concentración de azúcares es secar parcialmente la naranja hasta un 60 % (siendo el cociente de sólido seco a líquido de 7,5 %), con lo que se mantienen rendimientos superiores al 80 % y 50 g/L de azúcares totales.



Study on the effects of several operational variables on the enzymatic batch saccharification of orange solid waste



Isabel de la Torre^a, Marianela Ravelo^a, Silvia Segarra^b, Marta Tortajada^b, Victoria E. Santos^a, Miguel Ladero^{a,*}

^a Chemical Engineering Department, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

^b BIOPOLIS, S.L., Parc Científic Universitat de València, 46980, Paterna, Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Orange waste
Enzymatic saccharification
Enzyme concentration
Enzyme deactivation
Partial drying
Glucose yield

ABSTRACT

In this work, batch enzyme-aided extraction and enzymatic saccharification of blade-milled orange waste was studied. The operation variables for this process were thoroughly analysed. It was determined that batch runs with initial pH values of 5.0 and 5.2 controlled during the first hour, 50 °C and 300–500 r.p.m. agitation resulted in the best yields, with a limited total and partial first-order enzyme deactivation (for cellulases and polygalacturonidase, respectively). Orange peel waste (OPW) at 6.7% w/w dry solid, 0.22 filter paper units (FPU)/g DS and proportional activities of other enzymes led to over 40 g/L free monosaccharides and global yields to glucose over 80%. When using 10.1% w/w DS in these conditions, glucose yield was 63%, with total monosaccharide concentration on top of 50 g/L. Similar concentrations were obtained by additional partial drying of OPW to 60% humidity at DS/L ratios near 7.5% (glucose yield > 80%).

1. Introduction

Currently, due to a high dependence on oil, the energy and industrial sectors are mainly based on non-renewable sources. In addition, the massive use of oil and other fossil-based resources has resulted in a tremendous increase of environmental pollution; therefore, the development of an environmentally friendly and sustainable energy economy is greatly needed (FitzPatrick et al., 2010). This situation promotes the search for alternative energies such as hydraulic power, wind energy, nuclear energy and also energy based on biomass (FitzPatrick et al., 2010). Lignocellulosic biomass has aroused great interest in the last decades due to their high carbohydrate content (approximately 75%) and the presence of polyphenols, both able to release a considerable amount of energy (Zhao et al., 2012). Moreover, the increase of this kind of feedstock and waste comes hand in hand with the development of an industrialized human society that intensively uses agriculture, forest and other biomass-related resources. Subsequently, the need to optimally manage and reuse them is most evident in our days. Due to their integration, biorefineries are conceptually designed for such purpose so as to avoid a deficient management of this material (Choi et al., 2015; Negro et al., 2016). Biomass feedstock of interest for the so-called second generation biorefineries includes lignocellulosic biomass, agro-industrial residues and food waste. The use of such resources is mainly directed towards the

production of biofuels like bioethanol, but could also become an essential source of fermentable sugars to produce value-added products (Castro et al., 2015; Choi et al., 2015; Kim et al., 2008; Lee et al., 2009; Zhao et al., 2012). Feedstock for processes to bioethanol or other value-added products must be cheap, abundant, grow rapidly and have no competition with food crops. These conditions are fully met by citrus residues (Choi et al., 2015).

Citrus waste comes from a wide variety of fruits, being orange the most abundant. Every year, up to 50 MM tons of oranges are consumed, creating a huge amount of waste (OPW) (45–60% of the total fruit weight) that includes peels, pulp and seeds (Choi et al., 2015; Rafiq et al., 2016). For this reason, a large number of promising applications have been described in literature to valorize these leftovers. So far, the main application is as an ingredient for cattle feed or as a pelletized dry-solid fuel, but its processing results in highly polluted wastewater (Martín et al., 2010). Recently, the use of citrus waste to produce fertilizer, essential oils, pectin, ethanol, industrial enzymes, compounds of high added value, and absorbents has been described (Choi et al., 2015; Lugo-Lugo et al., 2012; Martín et al., 2010; Negro et al., 2016; Oberoi et al., 2010; Pourbafrani et al., 2010). Orange residues have a large amount of fermentable sugars, mainly glucose, fructose and sucrose, as well as insoluble polymers, including hemicellulose, cellulose, and pectin. Cellulose is a linear, crystalline polymer of β -D-glucose unit, with a rigid structure difficult to break, while hemicellulose is

* Corresponding author.

E-mail address: mladerog@ucm.es (M. Ladero).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.094>.

References

- Alagöz, D., Tükel, S.S., Yildirim, D., 2016. Immobilization of pectinase on silica-based supports: impacts of particle size and spacer arm on the activity. *Int. J. Biol. Macromol.* 87, 426–432.
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M., 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresour. Technol.* 101 (13), 4851–4861.
- Arantes, V., Saddler, J.N., 2011. Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. *Biotechnol. Biofuels* 4 (1), 3.
- Arevalo-Gallegos, A., Ahmad, Z., Asgher, M., Parra-Saldivar, R., Iqbal, H.M.N., 2017. Lignocellulose: a sustainable material to produce value-added products with a zero waste approach—a review. *Int. J. Biol. Macromol.* 99, 308–318.
- Bauer, N.A., Gibbons, W.R., 2012. Saccharification versus simultaneous saccharification and fermentation of kraft pulp. *Int. J. Agric. Biol. Eng.* 5 (1), 48–55.
- Bélafi-Bakó, K., Eszterle, M., Kiss, K., Nemestóthy, N., Gubicza, L., 2007. Hydrolysis of pectin by *Aspergillus niger* polygalacturonase in a membrane bioreactor. *J. Food Eng.* 78 (2), 438–442.
- Cardona, M.J., Tozzi, E.J., Karuna, N., Jeoh, T., Powell, R.L., McCarthy, M.J., 2015. A process for energy-efficient high-solids fed-batch enzymatic liquefaction of cellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 198, 488–496.
- Castro, Y.A., Ellis, J.T., Miller, C.D., Sims, R.C., 2015. Optimization of wastewater microalgae saccharification using dilute acid hydrolysis for acetone, butanol, and ethanol fermentation. *Appl. Energy* 140, 14–19.
- Chang, V.S., Holtzapfel, M.T., 2000. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84 (1), 5–37.
- Chesson, A., Forsberg, C., 1997. Polysaccharide Degradation by Rumen Microorganisms. *The Rumen Microbial Ecosystem*. Springer pp. 329–381.
- Choi, I.S., Lee, Y.G., Khanal, S.K., Park, B.J., Bae, H.-J., 2015. A low-energy, cost-effective approach to fruit and citrus peel waste processing for bioethanol production. *Appl. Energy* 140, 65–74.
- Chylenski, P., Forsberg, Z., Stahlberg, J., Varnai, A., Lersch, M., Bengtsson, O., Saebo, S., Horn, S.J., Eijssink, V.G., 2017. Development of minimal enzyme cocktails for hydrolysis of sulfite-pulped lignocellulosic biomass. *J. Biotechnol.* 246, 16–23.
- Dekker, R.F.H., 1986. Kinetic, inhibition, and stability properties of a commercial β -D-glucosidase (cellobiase) preparation from *Aspergillus niger* and its suitability in the hydrolysis of lignocellulose. *Biotechnol. Bioeng.* 28 (9), 1438–1442.
- Eibinger, M., Bubner, P., Ganner, T., Plank, H., Nidetzky, B., 2014. Surface structural dynamics of enzymatic cellulose degradation, revealed by combined kinetic and atomic force microscopy studies. *FEBS J.* 281 (1), 275–290.
- El-Nawawi, S.A., Heikal, Y.A., 1996. Production of pectin pomace and recovery of leach liquids from orange peel. *J. Food Eng.* 28 (3), 341–347.
- Farinas, C.S., Loyo, M.M., Baraldo, A., Tardioli, P.W., Neto, V.B., Couri, S., 2010. Finding stable cellulase and xylanase: evaluation of the synergistic effect of pH and temperature. *New Biotechnol.* 27 (6), 810–815.
- FitzPatrick, M., Champagne, P., Cunningham, M.F., Whitney, R.A., 2010. A biorefinery processing perspective: treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. *Bioresour. Technol.* 101 (23), 8915–8922.
- Guo, H., Su, R., Huang, R., Qi, W., He, Z., 2015. Co-optimization of sugar yield and input energy by the stepwise reduction of agitation rate during lignocellulose hydrolysis. *Food Bioprod. Process.* 95, 1–6.
- Jørgensen, H., Vibe-Pedersen, J., Larsen, J., Felby, C., 2007. Liquefaction of lignocellulose at high-solids concentrations. *Biotechnol. Bioeng.* 96 (5), 862–870.
- Kim, D.W., Jeong, Y.K., Jang, Y.H., Lee, J.K., 1994. Purification and characterization of endoglucanase and exoglucanase components from *Trichoderma viride*. *J. Ferment. Bioeng.* 77 (4), 363–369.
- Kim, J.K., Oh, B.R., Shin, H.-J., Eom, C.-Y., Kim, S.W., 2008. Statistical optimization of enzymatic saccharification and ethanol fermentation using food waste. *Process Biochem.* 43 (11), 1308–1312.
- Kumar, P., Ryan, B., Hennehan, G.T.M., 2017. β -Glucosidase from *Streptomyces griseus*: nanoparticle immobilisation and application to alkyl glucoside synthesis. *Protein Expr. Purif.* 132, 164–170.
- Lan, T.Q., Lou, H., Zhu, J.Y., 2013. Enzymatic saccharification of lignocelluloses should be conducted at elevated pH 5.2–6.2. *Bioenergy Res.* 6 (2), 476–485.
- Lee, J.-W., Rodrigues, R.C.L.B., Jeffries, T.W., 2009. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation of oxalic acid pretreated corn cob assessed with response surface methodology. *Bioresour. Technol.* 100 (24), 6307–6311.
- Lin, D., Lopez-Sanchez, P., Gidley, M.J., 2016. Interactions of pectins with cellulose during its synthesis in the absence of calcium. *Food Hydrocolloids* 52, 57–68.
- Lugo-Lugo, V., Barrera-Díaz, C., Ureña-Núñez, F., Bilyeu, B., Linares-Hernández, I., 2012. Biosorption of Cr(III) and Fe(III) in single and binary systems onto pretreated orange peel. *J. Environ. Manage.* 112, 120–127.
- Martín, M.A., Siles, J.A., Chica, A.F., Martín, A., 2010. Biomethanization of orange peel waste. *Bioresour. Technol.* 101 (23), 8993–8999.
- Maurya, D.P., Singla, A., Negi, S., 2015. An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. *3 Biotech.* 5 (5), 597–609.
- Negro, V., Mancini, G., Ruggeri, B., Fino, D., 2016. Citrus waste as feedstock for bio-based products recovery: review on limonene case study and energy valorization. *Bioresour. Technol.* 214, 806–815.
- Obero, H.S., Vadlani, P.V., Madl, R.L., Saida, L., Abeykoon, J.P., 2010. Ethanol production from orange peels: two-stage hydrolysis and fermentation studies using optimized parameters through experimental design. *J. Agric. Food Chem.* 58 (6), 3422–3429.
- Ortega, N., De Diego, S., Perez-Mateos, M., Busto, M., 2004. Kinetic properties and thermal behaviour of polygalacturonase used in fruit juice clarification. *Food Chem.* 88 (2), 209–217.
- Pourbafrani, M., Forgács, G., Horváth, I.S., Niklasson, C., Taherzadeh, M.J., 2010. Production of biofuels, limonene and pectin from citrus wastes. *Bioresour. Technol.* 101 (11), 4246–4250.
- Rafiq, S., Kaul, R., Sofi, S.A., Bashir, N., Nazir, F., Ahmad Nayik, G., 2016. Citrus peel as a source of functional ingredient: a review. *J. Saudi Soc. Agric. Sci.*
- Roche, C.M., Dibble, C.J., Stickel, J.J., 2009. Laboratory-scale method for enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass at high-solids loadings. *Biotechnol. Biofuels* 2 (1), 28.
- Rosales-Calderon, O., Trajano, H.L., Duff, S.J., 2014. Stability of commercial glucanase and β -glucosidase preparations under hydrolysis conditions. *PeerJ* 2, e402.
- Shen, J., Agblevor, F.A., 2008. Optimization of enzyme loading and hydrolytic time in the hydrolysis of mixtures of cotton gin waste and recycled paper sludge for the maximum profit rate. *Biochem. Eng. J.* 41 (3), 241–250.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D., 2008a. issue date, 4/25/2008 In: Sluiter, A. (Ed.), Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass laboratory analytical procedure (LAP). National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colo.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., 2006. Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples. National Renewable Energy Laboratory, Golden.
- Sluiter, A., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., 2008b. issue date, 7/17/2005 In: Sluiter, A. (Ed.), Determination of extractives in biomass laboratory analytical procedure (LAP). National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colo.
- Sun, S., Sun, S., Cao, X., Sun, R., 2016. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. *Bioresour. Technol.* 199, 49–58.
- Sun, Y., Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.* 83 (1), 1–11.
- Tamayo, J., Ladero, M., Santos, V., Garcia-Ochoa, F., 2012. Esterification of benzoic acid and glycerol to α -monobenzoate glycerol in solventless media using an industrial free Candida antarctica lipase B. *Process Biochem.* 47 (2), 243–250.
- Van Dyk, J., Pletschke, B., 2012. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnol. Adv.* 30 (6), 1458–1480.
- Van Dyk, J.S., Gama, R., Morrison, D., Swart, S., Pletschke, B.I., 2013. Food processing waste: Problems, current management and prospects for utilisation of the lignocellulose component through enzyme synergistic degradation. *Renewable Sustainable Energy Rev.* 26, 521–531.
- Várnai, A., Viikari, L., Marjamaa, K., Siika-aho, M., 2011. Adsorption of monocomponent enzymes in enzyme mixture analyzed quantitatively during hydrolysis of lignocellulose substrates. *Bioresour. Technol.* 102 (2), 1220–1227.
- Wojtusik, M., Zurita, M., Villar, J.C., Ladero, M., Garcia-Ochoa, F., 2016a. Enzymatic saccharification of acid pretreated corn stover: Empirical and fractal kinetic modeling. *Bioresour. Technol.* 220, 110–116.
- Wojtusik, M., Zurita, M., Villar, J.C., Ladero, M., Garcia-Ochoa, F., 2016b. Influence of fluid dynamic conditions on enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: effect of mass transfer rate. *Bioresour. Technol.* 216, 28–35.
- Ye, Z., Hatfield, K.M., Berson, R.E., 2012. Deactivation of individual cellulase components. *Bioresour. Technol.* 106, 133–137.
- Zhang, Y., Xu, J.-L., Xu, H.-J., Yuan, Z.-H., Guo, Y., 2010. Cellulase deactivation based kinetic modeling of enzymatic hydrolysis of steam-exploded wheat straw. *Bioresour. Technol.* 101 (21), 8261–8266.
- Zhao, X., Zhang, L., Liu, D., 2012. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biofuels, Bioprod. Biorefin.* 6 (4), 465–482.

PUBLICACIÓN 3

Autores: Isabel de la Torre, Victoria E. Santos y Miguel Ladero.

Título: D-lactic acid production from orange waste hydrolysates with *L. delbrueckii* cells in growing and resting state

Revista: Bioresource Technology (Enviado)

Índice de Impacto (2018): 6,669

Categoría: Ingeniería Agrícola; Biotecnología y Microbiología Aplicada; Energía y Combustibles.

Resumen:

La producción de ácido láctico es costosa debido a la materia prima que se emplea (almidón y caña de azúcar), por lo que reemplazarlo por residuos agroindustriales como son los residuos de naranja podría ser una estrategia que mejore el proceso desde el punto de vista económico. En este trabajo se lleva a cabo la hidrólisis de residuos de naranja parcialmente secos en operación *fed-batch*. Operar en *fed-batch*, permite reusar la enzima por lo que se opera a una baja carga enzimática, además de que permite incrementar el porcentaje de sólido al que se trabaja de 7,7 % inicial, hasta un 22 % final. El hidrolizado que se obtiene contiene más de 110 g/L de monosacáridos fermentables que serán empleados para producir ácido D-láctico. Para ello se emplea *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* como biocatalizador en crecimiento y con células en estado de reposo o *resting cells* y la producción se lleva a cabo empleando STBR. Además, se ajustan los datos experimentales obtenidos a un modelo cinético tipo Monod capaz de reproducir los resultados obtenidos tanto con células en estado de crecimiento como de *resting cells*.

1 **D-lactic acid production from orange waste hydrolysates with *L. delbrueckii* cells**
2 **in growing and resting state**

3 Isabel de la Torre, Miguel Ladero*, Victoria E. Santos

4 Chemical and Materials Engineering Department, Universidad Complutense de
5 Madrid. 28040 Madrid, Spain

6

7 **ABSTRACT**

8 D-lactic acid production faces costly production processes partly due to the cost of raw
9 materials. Replacing these raw materials with agrofood industrial residues could be a
10 strategy to improve this process economy provided that hydrolysates rich in
11 monosaccharides can be obtained from such residues and high yields to the acid could
12 be reached on these solutions. This paper reports on the fed-batch processing of
13 partially dried Orange Peel Waste (OPW) at low enzyme loadings, increasing the dry
14 solid content from 7.7 till 22 % w/w. The hydrolysate, containing >110 g/L
15 fermentable monosaccharides, was compared to a model sugar solution to produce D-
16 lactic acid using *Lactobacillus delbrueckii* sp. *delbrueckii* in a STBR, either in growing
17 or in resting state. This latter mode for the cells proved to be the most productive one.
18 Experimental data can be successfully explained by means of a kinetic model
19 previously proposed for this bioproduction process.

20

21 **KEYWORDS**

22 Orange waste; enzymatic saccharification; D-lactic acid; *Lactobacillus delbrueckii*;
23 fed-batch; resting cells

24

25 *To whom correspondence must be addressed. mladerog@ucm.es

26

27

1. INTRODUCTION

About 88 million tons of citrus fruit are produced each year, 80% of which corresponds to orange fruit. Approximately a 50 % w/w the total orange production is the main byproduct of citric industry and includes peel pulp and seeds. This orange peel waste (OPW) has a very high organic content (9,5 % w/w), including free fermentable sugars, some fats and polysaccharides; and it is highly humid, with an 80-90 % of water content. For these reasons, OPW is susceptible to undesirable and uncontrolled fermentations, so it should be disposed of or transformed into marketable byproducts, creating a major problem to juice industries (Negro et al., 2016; Satari & Karimi, 2018). Therefore, numerous applications have been described in literature (Rezzadori et al., 2012). OPW has some traditional applications, being an ingredient in animal fodder and a source of essential oils rich in limonene and of pectin (Boukroufa et al., 2015; Pourbafrani et al., 2010). More applications are being developed in the last years: biofertilizer, biosorbent (Lessa et al., 2017; Lugo-Lugo et al., 2012), carbon source in the microbial production of added value compounds (Rezzadori et al., 2012; Satari & Karimi, 2018). As cheap raw materials are needed to produce medium- to high-value products (biofuels, polymers and chemicals), the recycling of organic carbon-rich residues is looked upon as an interesting alternative to both reduce environmental problems and operation cost (OPEX), as an alternative or complement to petrochemical-based counterparts (Diaz et al., 2018). OPW is an optimal candidate for this type of applications due to its high content in free sugars easily extracted (about 10 % in glucose, fructose and sucrose), its high content in polymers (37 % of cellulose and 11 % hemicellulose) –whose saccharification renders fermentable monosaccharides as glucose, arabinose and galactose-, and its low content in lignin (7.5 %) -that inhibits and generates inhibitors by its hydrolysis reducing yields in the saccharification and fermentation processes- (Satari & Karimi, 2018).

As in the case of other lignocellulosic substrates, the enzymatic hydrolysis of OPW is influenced by physical, chemical and morphological characteristics of material that determines the accessible surface area to enzymes and the raw material reactivity (Sun et al., 2016; Zhao et al., 2012). Therefore, a wise choice of the pretreatment for a given biomass type will maximize yields to monosaccharides and, in consequence, to final products, while minimizing the cost of the whole process (Alvira et al., 2010; Sun et al., 2016). The compact and complex structure of the crystalline fraction of cellulose

61 results in a low enzymatic hydrolysis rate and, as a consequence, a low released of
62 glucose (Pocan et al., 2018). To create a pretreated biomass prone to saccharification,
63 several thermal, physical, chemical, physicochemical and biological pretreatments are
64 available (Maurya et al., 2015). In the case of OPW, Pocan et al. (2018) indicate that
65 that no lignin removal is to be considered but it is compulsory to either remove pectin
66 by acid pretreatments or hydrolyzed it by using pectinases. This pectin reduction
67 boosts definitely monosaccharide release (Pocan et al., 2018), and it is critical in view
68 of the high pectin mass percentage in OPW, up to 40 % of dry solid (Satari & Karimi,
69 2018).

70 The enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass requires of a mixture of enzymes
71 that includes, at least, cellulases and hemicellulases and, in the case of fruit waste that
72 includes pectin, pectinases are also critical (Sun & Cheng, 2002). The synergist effect
73 of all enzymes included in the final enzymatic cocktail permits high yields to
74 monosaccharides even in the presence of considerable solid concentration (Goncalves
75 et al., 2015; Kuo et al., 2017; Sun et al., 2015; Van Dyk et al., 2013). The amount of
76 all, and each, enzymes in the final mixture is also key, as a high dosage results in high
77 monosaccharides yields, but a low one is critical to achieve economic feasibility
78 (Chylenski et al., 2017; Kim et al., 2008; Kuo et al., 2017; Pocan et al., 2018; Shen &
79 Agblevor, 2008; Sopajarn & Sangwichien, 2015; Sun & Cheng, 2002). Another key
80 factor both in the saccharification and the fermentation stage is solid concentration. A
81 high dry solid amount is always looked for during hydrolysis to obtain a very high
82 glucose and, in general, monosaccharide concentration in the hydrolysate, but
83 cellobiose and monosaccharides are prone to act as competitive inhibitors of
84 glycosidases (Sun & Cheng, 2002). Therefore, fed-batch strategies for substrate and
85 enzyme feeding has been proposed to reduce inhibitory phenomena and enhance solid-
86 liquid mixing by reducing overall viscosity, promoting higher yields to
87 monosaccharides (Cui et al., 2014; Gao et al., 2014; Geng et al., 2015; Jung et al.,
88 2017; Liu et al., 2015; Sugiharto et al., 2016). Jung et al. reached up to 135 g/L glucose
89 from maleic acid-pretreated rice straw with Cellic Ctec 2 enzyme cocktail using a wise
90 selection of feedings and stirring speed (80 r.p.m.) during a 60 h fed-batch process
91 with 3 feedings at 0, 12 and 25 h, resulting in a final high solid concentration of 30 %
92 w/w (Jung et al., 2017).

OPW has been employed as a carbon source to produce a wide variety of products like ethanol, polyhydroxyalkanoates (PHA), bacterial cellulose, or methane by anaerobic digestions, among others (Kulkarni et al., 2015; Kuo et al., 2017; Martín et al., 2018; Wilkins et al., 2007). On the other side, D-lactic acid (D-LA) is an organic acid, produced mainly by lactic acid bacteria, that has gained interest due to its application in the synthesis of polylactic acid (PLAs), a biodegradable and environmentally friendly polymer (Martinez et al., 2013; Wang et al., 2015). As the manufacturing cost due to the monomer production (D-LA) is high, the use of a cheaper carbon source can reduce it. In addition to carbon source, the costs are increased by nutritional requirements of lactic acid bacteria and later purification costs (Martinez et al., 2013).

To obtain L- and D-lactic acid, several processes have been studied, including SHF (Separated Hydrolysis and Fermentation) and SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation) approaches, either in batch, repeated batch, fed-batch or continuous operation, this latter with cell recycle (Cubas-Cano et al., 2018). Hu et al. studied the production of lactic acid by *Lactobacillus pentosus* out of several agricultural stovers, and their results in the fed-batch SSF process led to more than 90 g/L acid at 37 °C and pH 6.0 starting from a NaOH-pretreated corn stover at 14 % w/w dry solid; they also used Cellic Ctec2 as the enzyme cocktail (Hu et al., 2016). Finally, *Lactobacillus coryniformis* subsp. *Torquens* has been tested as D-lactic acid producer able to transform Dried Distiller's Grains with Solubles (DDGS). The authors choose as the better process a SSF fed-batch strategy of NaOH-pretreated DDGS ending up with 38.1 g/L D-LA with a 99.9 % purity in 48 h (Zaini et al., 2019). In this case, the industrial enzyme cocktail was Accelerase® 1500. Finally, up to 90 g/L >98 % pure D-lactic acid has been produced by resting cells of *L. delbrueckii* sp. *delbrueckii* from enzymatic OPW hydrolysates, observing a 100% enhancement in productivity in comparison to the classical process with growing cells -6.72 g/(L·h) vs. 2.0-2.5 g/(L·h)- (de la Torre et al., 2019a).

The aim of this work is, firstly, to compare the fed batch enzymatic saccharification process of OPW at several enzyme loads to produce a hydrolysate highly rich in monosaccharides. Subsequently, this OPW hydrolysate was employed to produce D-lactic acid with growing and resting *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* cells. Both production strategies are compared and a kinetic model for D-lactic production is proposed and fitted to experimental data.

126 2. MATERIALS AND METHODS

127 2.1 RAW MATERIALS, ENZYMES AND HYDROLYSIS PROCEDURE

128 The raw material employed in this studies is orange peel waste (OPW) provided by
129 Biopolis S.L. (Paterna, Valencia). OPW was milled to a 2-4 mm particle size by blade
130 milling and stored at -20°C until used. The characterization of raw material was carried
131 out according to NREL methodology and the results are indicated in previous work
132 (de la Torre et al.2017). Enzymatic saccharification has been performed with a mixture
133 of cellulases and β -glucosidases from *Trichoderma reesei* (Celluclast 1.5 L)
134 supplemented with an enzymatic cocktail rich in β -glucosidases, xylanases and other
135 auxiliary enzymes from *Aspergillus niger* (Novozym 188). Another supplement was a
136 cocktail focused to the hydrolysis of pectin, Pectinex Ultra SP-L, a protein mixture
137 from *Aspergillus aculeatus* abundant in polygalacturonase. All enzymatic preparations
138 were kindly donated by Novozymes A/S. Upon receiving the samples, their main
139 activities were tested with filter paper Whatman 1, Avicel PH-101, polygalacturonic
140 acid and ONPG (o-nitrophenyl- β -D-glucoside) as indicated elsewhere (de la Torre et
141 al., 2017). In average, their main activities were as follows: Celluclast 1.5 L: 90
142 FPU/mL activity on filter paper; Novozyme 188: 3600 pNPG UI/mL activity on
143 ONPG; Pectinase Ultra SP-L: 3850 UI/mL polygalacturonidase activity.

144 Every hydrolysis run was performed in batch in a 1 L stirred tank reactor provided
145 with two 6-flat blade turbines mounted in the agitator shaft and moved by an IKA RW-
146 20 motor and an external jacket connected to a thermostatic bath. Thus, both agitation
147 (400 r.p.m.) and temperature (50 °C) turbine were carefully controlled. The
148 saccharification procedure started by mixing either a fresh or partially air-dried OPW
149 (from 60 till 80 % w/w water, to check the adequacy of relatively dry substrates to
150 reach high final monosaccharides concentrations) mixing 20 g dry solid and 200 mL
151 10 mM citrate buffer pH 5.0 (initial volumes from 250 mL -60 % humidity OPW- till
152 300 mL – 80 % humidity OPW-), adding the same amount of solid at 3.5, 24, 48 and
153 72 h, reaching final volumes between 450 and 700 mL, corresponding to final dry solid
154 content, respectively, from 22.2 % to 14.3 %. After the first addition, a 1:1:1
155 volumetric mixture of all enzymes cocktails was added to the suspension to start the
156 enzymatic- aided free sugar extraction and enzymatic saccharification of OPW. The
157 added combined enzyme volume was either low (18 mL/Kg dry OPW) or high (90

mL/Kg dry OPW), to test the convenience of reducing enzyme loads. In all cases, samples were withdrawn at selected reaction times, double-centrifuged and filtered to analyze them for their glucose, fructose, galactose, arabinose content *via* ion-exclusion HPLC in REZEX Ca²⁺ and H⁺ columns, as further explained in section 2.3.

2.2. STRAIN, CULTURE MEDIUM AND FERMENTATION PROCEDURE

Lactobacillus delbrueckii ssp *delbrueckii* CECT 286 was employed in growing and in resting state as a biocatalyst to produce D-Lactic acid. The strain was maintained at 80 °C in saline serum/glycerol 50 % v/v. Inocula were growth in MRS broth at 40 °C, 200 rpm, without pH control and microaerobic atmosphere generated by operating with closed bottles.

The experiments with growing cells were performed in 1L stirred tank bioreactor (STBR) BIOSTAT B-Plus (Sartorius AG, Germany) with a volume broth of 0.5L and initial biomass concentration of 0.1 g/L (5%v/v). The conditions were maintained at 40 °C, 200 r.p.m., and a pH of 5.8 controlled by adding NaOH 10 M, while the anaerobic atmosphere was kept by bubbling nitrogen previous to start.

The experiments employing resting cells were performed in two stages: a first stage to grow biomass and a second one where D-lactic acid is obtained. The first one was performed in 1L STBR with 1L of broth with 40 g/L of fructose, 37 g/L of corn steep liquor (CSL), 0.2 g/L of MgSO₄ 7 H₂O, 0.05 g/L of MnSO₄ and 2 g/L of K₂ HPO₄, with other experimental conditions as previously described. In the middle of the exponential phase of biomass growth, it was separated from the liquid broth by centrifugation and washed with isotonic NaCl serum. Afterwards, 10 g/L biomass were transferred to another 1L STBR to run the production phase. This second stage with no growth of cells was performed at 40 °C, 800 r.p.m., a pH of 5.8 maintained by adding NaOH 5M and keeping anaerobic conditions by bubbling nitrogen.

The culture broths employed for experiments with growing and no growing cells were: (a) 100 % orange peel hydrolysate, (b) 80 % of orange peel hydrolysate –slightly diluted- (both previously sterilized by filtration) and (c) model solutions of monosaccharides whose composition were similar or equal to the mentioned hydrolysates). In the experiments with growing cells, 37 g/L of CSL were also added.

189 2.3 ANALYTICAL METHODS

190 The samples of hydrolysis were analyzed by ion-exclusion HPLC (Agilent
191 Technologies 1100 Series, USA) using a REZEX RCM-monosaccharide Ca^{2+} (8%)
192 column. Refractive Index Detector (RID) was used to determinate glucose, fructose,
193 galactose and arabinose concentration. Pure grade-II water was employed as mobile
194 phase at 0.5 mL/min flow rate.

195 The samples of fermentation were analyzed by HPLC using RID at 55°C to
196 determinate glucose, fructose, galactose, arabinose and lactic acid concentration. A
197 Rezex ROA-Organic Acid H^+ (8%) column (300 x 7.8mm; Phenomenex, USA) was
198 used at 80°C. The mobile phase was H_2SO_4 5 mM at a flow rate of 0.5 mL/min. The
199 purity of isomer D was determined by chiral HPLC using a DAD detector and a
200 Chirex 3126 (D)-penicillamine (250 x 4.6; Phenomenex, USA) column working at
201 room temperature. In this case, CuSO_4 1 mM was used as mobile phase at 1.2 mL/min
202 flow rate. Biomass evolutions was measured by UV-vis spectrophotometry as optical
203 density at 600 nm (Shimadzu UV-visible spectrophotometer UV-1603, Japan).

204 2.4 MATHEMATICAL METHODS FOR KINETIC MODELS

205 The data obtained in fermentation process were fitted to a previously proposed kinetic
206 model (de la Torre *et al.*, 2019b). For this purpose, Aspen Custom Modeler® program
207 was used through the combination of numerical integration of the model set of
208 differential equations with the implicit Euler method and regression with a “non-linear
209 least-squares solver” algorithm (NL2SOL). This latter calculates the equation
210 parameters by minimizing the difference between the experimental data and the model
211 simulation was used since the set of equations are nonlinear (John E. Dennis *et al.*,
212 1981). The goodness of fit of the kinetic model to experimental data was evaluated by
213 several parameters based on the sum of squared residues or variances for the C
214 components in the broth (SSR) but correcting for the degrees of freedom (equal to N-
215 K; where N is the data number and K, the number of kinetic parameters in the model):
216 RMSE (residual mean squared error, which should trend to zero), F-test (with an
217 optimum value as high as possible and always over the minimum or tabulated value)
218 and the percentage of variation explained (%VE) (a parameter that explains the fit of
219 the rate estimated by the model to the experimental variation with time of the

dependent variable, concentrations in this case and, again, the highest percentage is, the better the fit is).

$$SSR = \sum_{j=1}^{j=C} \sum_{i=1}^{i=N} (C_{jn \text{ exp}} - C_{jn \text{ calc}}) \quad (1)$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{SSR}{N-K}} \quad (2)$$

$$F = \frac{\sum_{j=1}^{j=C} \sum_{n=1}^{n=N} \left(\frac{C_{j,calc}}{K} \right)^2}{\sum_{j=1}^{j=C} \sum_{n=1}^{n=N} \left(\frac{SSR}{N-K} \right)} \quad (3)$$

$$VE(\%) = 100 \left(1 - \frac{\sum_{l=1}^L SSQ_l}{\sum_{l=1}^L SSQ_{mean_l}} \right) \quad (4)$$

3. RESULTS

3.1 OPW ENZYMATIC SACCHARIFICATION

OPW saccharification runs were performed in a fed-batch operation, so to increase the final concentration of all monosaccharides. The process itself was a mixture of enzyme-aided extraction and cellulose and hemicellulose hydrolysis, as the amount of free sugars in the solid is high (up to 35 % in mass percentage), while the sum of cellulose and hemicellulose is similar.

Runs were performed at high concentration of enzymes, as classically performed in literature works, and minimizing this concentration so to reduce its economic impact (Velasco et al., 2017). In **Figure 1**, it is evident that each loading of OPW rapidly increases the sugar concentration in the liquid (as examples, glucose and total fermentable sugars, that is, the sum of glucose, galactose and fructose, are shown). This rapid surge after each addition is due to the fast liberation on free sugars, mainly glucose and fructose, by enzyme-aided extraction (El Kantar et al., 2018). The enzymatic saccharification process in every cycle is slower, a trend that is clearly shown when considering the sum of fermentable sugars (in **Fig.1 B** and **D**) or runs performed at low enzyme concentration (**Fig. 1 C** and **D**). The capacity of the reacting liquid to extract the free glucose and fructose slightly reduces up to the fourth addition (from 3 to 2.8 g_{glu}/h, or from 7.9 to 7.8 g_{fru}/h in the third and fourth feeding), sharply decreasing in the fifth addition (till 2 g_{glu}/h and 5.5 g_{fru}/h). This fact suggests a grace-period deactivation scheme, where the enzymes maintain their activity for a certain operation time (or number of cycles or feedings), entering in a fast deactivation period afterwards. The mild activity reduction during the grace period can be attributed to the

249 well-known inhibition by products that suffer both glucanases and β -glucosidases
250 (Wojtusik et al., 2018).

251 A dramatic reduction in the doses of enzymes (by a factor of 8.5) does not reflect on a
252 similar reduction in global yields and final concentrations, as shown in **Tables 2** and
253 **3**: glucose reduces from 80-90 % yield (depending on OPW humidity) to about 70 %
254 yield (with no apparent dependence of the waste humidity), while the yield to total
255 fermentable sugars reduces from 85-92 % and 120 g/L with partially dried OPW at
256 60% water till 76-78 % and 110 g/L and the same waste. Therefore, as a high
257 percentage (approx. 40% of total monosaccharides are as such in OPW, a low amount
258 of enzyme suffices to reach a notable concentration of monosaccharides at the end of
259 the saccharification-extraction process. This is particularly clear in the case of fructose,
260 with almost total extraction at 96 h either using the high or the low concentrations of
261 enzymes.

262 The water content of the residue (from 60 till 80 %) scarcely affected the final yields
263 to most monosaccharide at both low and high concentrations of enzymes, but for the
264 case of glucose and high concentration of enzymes: here, yields were as high as 90-92
265 % at 75-80 % water, and reduced till 70 % when drying OPW till 60 % humidity.
266 Probably, a reason would be enzyme overcrowding and it seems to affect glucanases,
267 as they work mainly on the cellulose surface (Wojtusik et al., 2018). However, neither
268 the release of galactose nor the one of arabinose was affected in the least, suggesting
269 a scarce effect of water content on the backbone and side chains of OPW
270 hemicellulases.

271 Finally, as low enzyme concentration and high final concentrations of
272 monosaccharides were of interest for D-lactic production, hydrolysate for this next
273 process were obtained with 60% humid OPW using enzyme cocktail 2. In these
274 conditions, with five OPW additions during a 96 h process, liquids with more than 60
275 g/L glucose, g/L fructose, 9 g/L galactose and 8 g/L arabinose were obtained.

276 3.2. FERMENTATION PROCESSES WITH *L. DELBRUECKII*

277 D-Lactic acid was produced in batch processes where the biocatalyst was either
278 growing cells of *L. delbrueckii* ssp *delbrueckii* or cells of this microorganism in resting
279 state, that is, without addition of any nitrogen source so to reduce or avoid bacterial
280 reproduction.

3.2.1 D-LACTIC ACID PRODUCTION WITH CELLS IN GROWING STATE

OPW enzymatic hydrolysates, obtained as previously described, were employed to carry out two experiments with growing cells to produce D-lactic acid. One of them was performed with 100% OPW hydrolysate, the other, with 80% of hydrolysate as a culture broth. Both runs were compared to a third one where the carbon substrate was a mixtures of monosaccharides resembling the composition of the pure OPW hydrolysate. The culture media for these three runs was supplemented with 37 g/L CSL. The results of these runs are displayed in **Figure 2**, which contains the time course of carbon substrates (glucose -Figure 2B-, fructose and galactose -Figure 2C), of the product of interest (D-lactic acid -Figure 2D-) and of biomass -Figure 2A-. In all these three runs, the fermentation temporal profile is similar: glucose is the first monosaccharide to be uptaken by the cells, and it is used both for growth and for production. When the broth is devoid of glucose, the microorganism uses fructose and galactose only for D-lactic acid production. Moreover, these latter monosaccharides are consumed at a slower rate. Therefore, the strain has a much lower affinity for monosaccharides that are not glucose. Even more, arabinose, a main constituent of OPW hemicelluloses, is only slightly uptaken by *L. delbrueckii*.

Figure 2 shows no great differences on fructose and galactose uptake rate (**Figure 2C**) an D-lactic acid production rate (**Figure 2D**) are observed. However, when using the higher monosaccharides concentrations are used (both model medium and hydrolysate), glucose uptake (**Figure 2B**) is faster when the model medium is used, probably due to the presence of toxic compounds, such as limonene and other components of the orange essential oil, in one hand, and some phenolics (naringin, hesperidin) on the other. As antimicrobials, they slow down or impede bioprocesses (Boluda-Aguilar & López-Gómez, 2013; Wilkins et al., 2007). The same effect is observed on growth, it is slower when using hydrolysate but, due to its proteins content, the biomass concentration reached at the stationary growth phase is higher (5.5 g/L on hydrolysates, but only till 4.5 g/L in the sugars solution). It is remarkable the run performed using diluted hydrolyzed shows a growth rate very close to that one observed when model medium is used but it reaches the biomass concentration from the hydrolysate without dilution; this observation supports the toxic effect previously explained. In this last case, all monosaccharides, but arabinose, are consumed during the D-lactic acid production process.

314 3.2.2. D-LACTIC ACID PRODUCTION WITH CELLS IN RESTING STATE

315 Similar experiments as those described in the previous section were performed with
316 cells in resting state. The results have been collected in **Figure 3**: biomass -Figure 3A-
317 ; glucose -Figure 3B-, fructose and galactose -Figure 3C- and D-lactic acid -Figure
318 3D-. The temporal evolution of all components is relatively similar to the one observed
319 in the growing cell experiments: glucose is the monosaccharide firstly consumed,
320 being the mixture fructose+galactose employed only for D-lactic acid production, and
321 at a slower rate. The presence of proteins in OPW hydrolysates explains the growth of
322 the microorganism (with an increment from 9 to 13 g/L when living on the hydrolysate,
323 and from 9 to 12 g/L in the diluted one). As OPW protein contents about 8.7 % w/w
324 dry solid and protease activity is observed in secretomes of *Trichoderma* and
325 *Aspergillus* molds, it can be hypothesized that free proteins and peptides are present in
326 the production media, sustaining bacterial growth. In a previous work, the influence of
327 the nitrogen source, its nature and concentration, on the consumption of glucose and
328 the tandem fructose+galactose was clearly shown for growing cells: the uptake of
329 fructose and galactose heavily depended on having enough nitrogen available (de la
330 Torre et al., 2018). This was not so evident for cells in resting state, even if they had
331 been adapted to fructose in the inoculum built-up phase (de la Torre et al. 2019a).

332 Moreover, as observed when using growing cells (by media supplementation with
333 CSL), the dilution of the hydrolysate yields higher growth rate, but no differences on
334 biomass concentration at the stationary growth phase are achieved in runs carried out
335 with hydrolysate. On one hand, it is remarkable that both glucose uptake (**Figure 3B**)
336 and the D-lactic acid production rate (**Figure 3D**) present no significant differences
337 when using the higher monosaccharides concentration (runs using model medium and
338 hydrolysate). On the other hand, it can be observed a very high increase on fructose
339 and galactose uptake rate when diluted the hydrolysate. This effect has to be due to the
340 lower concentration of both monosaccharides and toxic compounds. Thus,
341 concentrations of OPW hydrolysate components, including the own monosaccharides,
342 that negatively affect the consumption of these sugars have key values beyond which
343 those effects are notable, and this fact is much more evident when working with resting
344 cells. In particular, in resting cells, a higher substrate concentration reduces its own
345 consumption, as evidence before for glucose, fructose and galactose. This factor can
346 join others, as biocatalyst deactivation in resting state, the nature of the base employed

to maintain pH or the absence of nitrogen source and other factors needed by the bacterium (Joshi et al., 2010; Kwan et al., 2017; Lu et al., 2009; Qin et al., 2010; Yu et al., 2008).

These results show that, at least for one production cycle, the activity of resting cells is similar to their growing counterparts and, as a consequence, growth and production can be separated, being the composition of the production medium notably simpler in the resting case, an aspect that simplifies the subsequent D-lactic acid purification.

3.2.3. GROWING VERSUS RESTING CELL

To compare results for growing and resting cells, **Figures 2** and **3** can be compared. When working with cells in growing or resting state, some basic parameters have been estimated to compare their efficiency as D-lactic acid producers: titer (C_{lac}^{max}), acid yield ($Y_{P,S}$) –as obtained from equation (5)- and productivity (P) of D-lactic acid –calculated by means of equation (6)-. D-lactic acid titer, yield and productivity are displayed in **Table 4**.

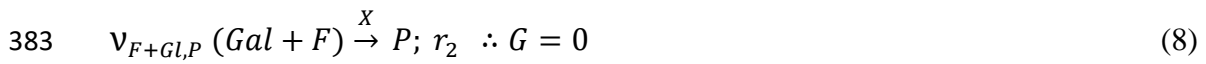
$$Y_{P,S} = \frac{C_{lac}^{max}}{C_{Consumed\ substrates}} \quad (5)$$

$$P = \frac{C_{lac}^{max}}{t} \quad (6)$$

When employed in growing conditions, *L. delbrueckii* grows and produces on glucose, adapting its metabolism to this substrate. Once the liquid is free from glucose, cells stop growing, while maintaining a much slower production of D-lactic acid on fructose and galactose. This fact is reflected by high yields and titers and low productivities. On the other side, if working in resting state, the cells are able to work on fructose more efficiently, as the inoculum has been built with fructose and galactose as the substrates and the microorganism is adapted to these carbon sources. Thus, a high concentration of biomass at time zero in the production phase, coupled to its being adapted to the monosaccharides being transformed, results in high titers, yields and productivities. This fact is particularly obvious when working with the diluted hydrolysate: a high yield to D-lactic acid (89.7 %) is obtained, reaching high concentrations of the same acid (81.4 g/L) and notable productivity (3.70 g/(L·h)).

3.2.4. KINETIC MODELLING

The evolution through fermentation time of the relevant components, in terms of concentration, has shown the same qualitative profiles for all the compounds when using CSL for supplementing the media and hydrolyzed OPW. Therefore, the same kinetic model can be used to describe these five runs. In consequence, the production process can be explained by the same kinetic model previously proposed (de la Torre et al., 2019b), involving the following reaction scheme:



and the following kinetic equations:

$$r_1 = \frac{\mu C_G C_X}{K_S + C_G} \quad (9)$$

$$r_2 = k_p C_{F+Gal} C_X \quad (10)$$

Figures 4 and **5** show the very good model prediction obtained by fitting it to the experimental data for the runs with growing cells (Figure 4) and resting cells (Figure 5). Moreover, goodness-of-fit and error parameters for the fits are displayed in **Table 5** while kinetic parameters values are collected in **Table 6**. As reflected by goodness-of-fit parameters in **Table 5** and by the curves of each model in relation to experimental data (lines and points in **Figures 4** and **5**), the model can fit very nicely to experimental data. SSR and RMSE values are relatively low, the values of the Fisher's parameter F_{95} are very high (even better for the hydrolysates) and much higher than the threshold value of this parameter (tabulated F value at 95% confidence), indicating the adequacy of the proposed model to fit experimental data. The percentage of variance (VE) explained by the models for cells working in growing and in resting stage is 99 % or higher, indicating that the rates of change of the concentrations with time as calculated by those models is almost the same as that estimated from the experimental data, so the models represent very closely the change of all concentrations with time.

On **Table 6** (growing cells columns) can be observed maximum specific growth rate (μ_m) to present the same value when the monosaccharides concentration used is the more or less the same, having into account the errors; but when using the diluted hydrolysate, its value is higher. On the other kinetic parameters there is no significance difference. Considering the stoichiometric ones (macroscopic yields, really) from the

first process stage (consuming glucose, growing and DLA production - v_{GX} and v_{PX} -) the values observed are higher again when the diluted hydrolysate is used and the values for the other runs are very close. The macroscopic yield value of DLA referred to glucose (calculated from equation 11) for these three runs show for all of them values around 0,80. The values for the macroscopic yield for DLA production from fructose and galactose - $v_{F+Gal,P}$ is near 1 for all the runs.

$$Y_{PG}\left(\frac{g_P}{g_P}\right) = \frac{v_{PX}}{v_{GX}} \quad (11)$$

The runs carried out without CSL (resting cells experiments) show no differences on the model parameter values between both experiments. The only one to be significantly different is the DLA production rate (k_P) that shows a very higher value when using the diluted hydrolysate, which indicates the inhibitory effect of both the high concentration of these monosaccharides when the availability of nitrogen source in the environment is low, and the presence of toxic substances from the enzymatic hydrolysis stage of the residue. In this case, the values of yield for the production on of D-lactic acid from glucose predicted by the model (according to equation 11) are higher than those obtained for growing cells runs.

When comparing the values of the parameters of the model, shown in Table 6, when cells in growth state and in resting cells state are used, the following can be observed: the parameters values obtained in presence and absence of CSL are, in general, quite close. Likewise, it should be noted that experiments carried out without the addition of CSL show lower values for the maximum specific growth rate, probably due to the lower availability of nitrogen compounds in the culture medium. On the other hand, the effect of inhibition due to fructose and galactose (collected in the value of parameter k_P) is more evident also in the case of not supplementing the hydrolyzed residue with CSL (with cells in resting state): with high concentrations of monosaccharides the rate is much lower, obtaining a much higher parameter value (although within the same range as using growing cells) when the concentrations of these monosaccharides and toxic compounds are reduced by diluting the hydrolyzed.

4. CONCLUSIONS

435 In enzyme-aided extraction coupled to saccharification processes, OPW has been
436 treated with low enzyme loadings in fed-batch processes to render hydrolysates rich in
437 glucose, fructose, galactose and arabinose (>110 g/L total concentration). Such liquids
438 have been employed as carbon source to produce D-lactic acid with *Lactobacillus*
439 *delbrueckii* sp. *delbrueckii*, using either growing or resting cells in batch, with similar
440 results to those obtained with model solutions with the same sugar composition. The
441 latter procedure can double D-lactic acid productivity and decouples biomass and
442 chemical production stages. Finally, a simple kinetic model was successfully fitted to
443 all data.

444 5. ACKNOWLEDGMENTS

445 This work has been supported by MICINN under contracts CTQ2013-45970-C2-1-R,
446 CTQ2017-84963-C2-1-R and PCIN-2013-021-C02-01.

447 6. REFERENCES

- 448 Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M. 2010. Pretreatment technologies for an
449 efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review.
450 Bioresource technology, 101(13), 4851-4861.
- 451 Boluda-Aguilar, M., López-Gómez, A. 2013. Production of bioethanol by fermentation of
452 lemon (*Citrus limon* L.) peel wastes pretreated with steam explosion. Industrial Crops
453 and Products, 41, 188-197.
- 454 Boukroufa, M., Boutekedjiret, C., Petigny, L., Rakotomanomana, N., Chemat, F. 2015. Bio-
455 refinery of orange peels waste: a new concept based on integrated green and solvent
456 free extraction processes using ultrasound and microwave techniques to obtain
457 essential oil, polyphenols and pectin. Ultrasonics Sonochemistry, 24, 72-79.
- 458 Cubas-Cano, E., González-Fernández, C., Ballesteros, M., Tomás-Pejó, E. 2018.
459 Biotechnological advances in lactic acid production by lactic acid bacteria:
460 lignocellulose as novel substrate. Biofuels, Bioproducts and Biorefining, 12(2), 290-
461 303.
- 462 Cui, M., Zhang, Y., Huang, R., Su, R., Qi, W., He, Z. 2014. Enhanced enzymatic hydrolysis
463 of lignocellulose by integrated decrystallization and fed-batch operation. RSC
464 Advances, 4(84), 44659-44665.
- 465 Chylenski, P., Forsberg, Z., Ståhlberg, J., Várnai, A., Lersch, M., Bengtsson, O., Sæbø, S.,
466 Horn, S.J., Eijssink, V.G. 2017. Development of minimal enzyme cocktails for
467 hydrolysis of sulfite-pulped lignocellulosic biomass. Journal of biotechnology, 246,
468 16-23.

- de la Torre, I., Acedos, M.G., Ladero, M., Santos, V.E. 2019a. On the use of resting *L. delbrueckii* spp. *delbrueckii* cells for D-lactic acid production from orange peel wastes hydrolysates. *Biochemical Engineering Journal*, 145, 162-169.
- de la Torre, I., Ladero, M., Santos, V.E. 2019b. Production of D-lactic acid by *L. delbrueckii* growing on orange peel waste hydrolysates and model monosaccharide solutions: effects of pH and temperature on process kinetics. *Biomass Conversion and Biorefinery*.
- de la Torre, I., Ladero, M., Santos, V.E. 2018. Production of d-lactic acid by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* from orange peel waste: techno-economical assessment of nitrogen sources. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(24), 10511-10521.
- de la Torre, I., Ravelo, M., Segarra, S., Tortajada, M., Santos, V.E., Ladero, M. 2017. Study on the effects of several operational variables on the enzymatic batch saccharification of orange solid waste. *Bioresource Technology*, 245, 906-915.
- Diaz, A.B., Blandino, A., Caro, I. 2018. Value added products from fermentation of sugars derived from agro-food residues. *Trends in Food Science & Technology*, 71, 52-64.
- El Kantar, S., Boussetta, N., Rajha, H.N., Maroun, R.G., Louka, N., Vorobiev, E. 2018. High voltage electrical discharges combined with enzymatic hydrolysis for extraction of polyphenols and fermentable sugars from orange peels. *Food Research International*, 107, 755-762.
- Gao, Y., Xu, J., Yuan, Z., Zhang, Y., Liu, Y., Liang, C. 2014. Optimization of fed-batch enzymatic hydrolysis from alkali-pretreated sugarcane bagasse for high-concentration sugar production. *Bioresource technology*, 167, 41-45.
- Geng, W., Jin, Y., Jameel, H., Park, S. 2015. Strategies to achieve high-solids enzymatic hydrolysis of dilute-acid pretreated corn stover. *Bioresource technology*, 187, 43-48.
- Goncalves, G.A., Takasugi, Y., Jia, L., Mori, Y., Noda, S., Tanaka, T., Ichinose, H., Kamiya, N. 2015. Synergistic effect and application of xylanases as accessory enzymes to enhance the hydrolysis of pretreated bagasse. *Enzyme and microbial technology*, 72, 16-24.
- Hu, J., Lin, Y., Zhang, Z., Xiang, T., Mei, Y., Zhao, S., Liang, Y., Peng, N. 2016. High-titer lactic acid production by *Lactobacillus pentosus* FL0421 from corn stover using fed-batch simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource Technology*, 214, 74-80.
- Joshi, D.S., Singhvi, M.S., Khire, J.M., Gokhale, D.V. 2010. Strain improvement of *Lactobacillus lactis* for d-lactic acid production. *Biotechnology Letters*, 32(4), 517-520.

505 Jung, Y.H., Park, H.M., Kim, D.H., Yang, J., Kim, K.H. 2017. Fed-Batch enzymatic
506 saccharification of high solids pretreated lignocellulose for obtaining high titers and
507 high yields of glucose. *Applied biochemistry and biotechnology*, 182(3), 1108-1120.

508 Kim, J.K., Oh, B.R., Shin, H.-J., Eom, C.-Y., Kim, S.W. 2008. Statistical optimization of
509 enzymatic saccharification and ethanol fermentation using food waste. *Process*
510 *Biochemistry*, 43(11), 1308-1312.

511 Kulkarni, S., Kanekar, P., Jog, J., Sarnaik, S., Nilegaonkar, S. 2015. Production of copolymer,
512 poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Halomonas campisalis* MCM B-1027
513 using agro-wastes. *International journal of biological macromolecules*, 72, 784-789.

514 Kuo, C.-H., Huang, C.-Y., Shieh, C.-J., Wang, H.-M.D., Tseng, C.-Y. 2017. Hydrolysis of
515 orange peel with cellulase and pectinase to produce bacterial cellulose using
516 *Gluconacetobacter xylinus*. *Waste and Biomass Valorization*, 1-9.

517 Kwan, T.H., Vlysidis, A., Wu, Z., Hu, Y., Koutinas, A., Lin, C.S.K. 2017. Lactic acid
518 fermentation modelling of *Streptococcus thermophilus* YI-B1 and *Lactobacillus casei*
519 *Shirota* using food waste derived media. *Biochemical engineering journal*, 127, 97-
520 109.

521 Lessa, E.F., Gularte, M.S., Garcia, E.S., Fajardo, A.R. 2017. Orange waste: A valuable
522 carbohydrate source for the development of beads with enhanced adsorption properties
523 for cationic dyes. *Carbohydrate polymers*, 157, 660-668.

524 Liu, Y., Xu, J., Zhang, Y., Yuan, Z., Xie, J. 2015. Optimization of high solids fed-batch
525 saccharification of sugarcane bagasse based on system viscosity changes. *Journal of*
526 *Biotechnology*, 211, 5-9.

527 Lu, Z., Lu, M., He, F., Yu, L. 2009. An economical approach for D-lactic acid production
528 utilizing unpolished rice from aging paddy as major nutrient source. *Bioresource*
529 *Technology*, 100(6), 2026-2031.

530 Lugo-Lugo, V., Barrera-Díaz, C., Ureña-Núñez, F., Bilyeu, B., Linares-Hernández, I. 2012.
531 Biosorption of Cr (III) and Fe (III) in single and binary systems onto pretreated orange
532 peel. *Journal of Environmental Management*, 112, 120-127.

533 Martín, M., Fernández, R., Gutiérrez, M., Siles, J. 2018. Thermophilic anaerobic digestion of
534 pre-treated orange peel: Modelling of methane production. *Process Safety and*
535 *Environmental Protection*, 117, 245-253.

536 Martinez, F.A.C., Balciunas, E.M., Salgado, J.M., González, J.M.D., Converti, A., de Souza
537 Oliveira, R.P. 2013. Lactic acid properties, applications and production: a review.
538 *Trends in food science & technology*, 30(1), 70-83.

- Maurya, D.P., Singla, A., Negi, S. 2015. An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. 3 Biotech, 5(5), 597-609.
- Negro, V., Mancini, G., Ruggeri, B., Fino, D. 2016. Citrus waste as feedstock for bio-based products recovery: Review on limonene case study and energy valorization. Bioresource Technology, 214, 806-815.
- Pocan, P., Bahcegul, E., Oztop, M.H., Hamamci, H. 2018. Enzymatic hydrolysis of fruit peels and other lignocellulosic biomass as a source of sugar. Waste and Biomass Valorization, 9(6), 929-937.
- Pourbafrani, M., Forgács, G., Horváth, I.S., Niklasson, C., Taherzadeh, M.J. 2010. Production of biofuels, limonene and pectin from citrus wastes. Bioresource technology, 101(11), 4246-4250.
- Qin, J., Wang, X., Zheng, Z., Ma, C., Tang, H., Xu, P. 2010. Production of L-lactic acid by a thermophilic *Bacillus* mutant using sodium hydroxide as neutralizing agent. Bioresource technology, 101(19), 7570-7576.
- Rezzadori, K., Benedetti, S., Amante, E. 2012. Proposals for the residues recovery: orange waste as raw material for new products. Food and bioproducts processing, 90(4), 606-614.
- Satari, B., Karimi, K. 2018. Citrus processing wastes: Environmental impacts, recent advances, and future perspectives in total valorization. Resources, Conservation and Recycling, 129, 153-167.
- Shen, J., Agblevor, F.A. 2008. Optimization of enzyme loading and hydrolytic time in the hydrolysis of mixtures of cotton gin waste and recycled paper sludge for the maximum profit rate. Biochemical Engineering Journal, 41(3), 241-250.
- Sopajarn, A., Sangwichien, C. 2015. Optimization of enzymatic saccharification of alkali pretreated *Typha angustifolia* for glucose production. International Journal of Chemical Engineering and Applications, 6(4), 232.
- Sugiharto, Y.E.C., Harimawan, A., Kresnowati, M.T.A.P., Purwadi, R., Mariyana, R., Fitriana, H.N., Hosen, H.F. 2016. Enzyme feeding strategies for better fed-batch enzymatic hydrolysis of empty fruit bunch. Bioresource technology, 207, 175-179.
- Sun, F.F., Hong, J., Hu, J., Saddler, J.N., Fang, X., Zhang, Z., Shen, S. 2015. Accessory enzymes influence cellulase hydrolysis of the model substrate and the realistic lignocellulosic biomass. Enzyme and microbial technology, 79, 42-48.
- Sun, S., Sun, S., Cao, X., Sun, R. 2016. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. Bioresource technology, 199, 49-58.
- Sun, Y., Cheng, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. Bioresource technology, 83(1), 1-11.

- 576 Van Dyk, J., Gama, R., Morrison, D., Swart, S., Pletschke, B. 2013. Food processing waste:
577 Problems, current management and prospects for utilisation of the lignocellulose
578 component through enzyme synergistic degradation. *Renewable and Sustainable*
579 *Energy Reviews*, 26, 521-531.
- 580 Velasco, D., Senit, J.J., De la Torre, I., Santos, T.M., Yustos, P., Santos, V.E., Ladero, M.
581 2017. Optimization of the enzymatic saccharification process of milled orange wastes.
582 *Fermentation*, 3(3), 37.
- 583 Wang, Y., Tashiro, Y., Sonomoto, K. 2015. Fermentative production of lactic acid from
584 renewable materials: Recent achievements, prospects, and limits. *Journal of*
585 *Bioscience and Bioengineering*, 119(1), 10-18.
- 586 Wilkins, M.R., Widmer, W.W., Grohmann, K. 2007. Simultaneous saccharification and
587 fermentation of citrus peel waste by *Saccharomyces cerevisiae* to produce ethanol.
588 *Process Biochemistry*, 42(12), 1614-1619.
- 589 Wojtusik, M., Villar, J.C., Ladero, M., Garcia-Ochoa, F. 2018. Physico-chemical kinetic
590 modelling of hydrolysis of a steam-explosion pre-treated corn stover: A two-step
591 approach. *Bioresource Technology*, 268, 592-598.
- 592 Yu, L., Pei, X., Lei, T., Wang, Y., Feng, Y. 2008. Genome shuffling enhanced l-lactic acid
593 production by improving glucose tolerance of *Lactobacillus rhamnosus*. *Journal of*
594 *Biotechnology*, 134(1), 154-159.
- 595 Zaini, N.A.B.M., Chatzifragkou, A., Charalampopoulos, D. 2019. Microbial production of D-
596 lactic acid from dried distiller's grains with solubles. *Engineering in Life Sciences*,
597 19(1), 21-30.
- 598 Zhao, X., Zhang, L., Liu, D. 2012. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions
599 and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biofuels*,
600 *Bioproducts and Biorefining*, 6(4), 465-482.

601
602
603
604
605
606
607

608 6. TABLES AND FIGURES CAPTIONS

609 **Table 1.** Composition of selected enzyme mixtures of cellulases, β -glucosidase,
610 polygalacturonase, xylanase, and other auxiliary activities for the fed batch
611 saccharification of OPW solids.

- Table 2.** Final yields to relevant monosaccharides, and their sum, after 96h of fed batch saccharification (5 feedings), at several initial content of water in the solids and using cocktail 1 of enzymes
- Table 3.** Final yields to fermentable monosaccharides, and their sum, at 96 h of fed batch saccharification (5 feedings), at several initial content of water in the solids and using cocktail 2 of enzymes
- Table 4.** Main experimental parameters (titer, yield and productivity) for different experiments using growing and resting cells
- Table 5.** Statistical parameters calculated for different experiments employing growing and resting cells
- Table 6.** Kinetic model parameters calculated for different experiments with growing and resting cells
- Figure 1.** Temporal evolution of glucose (A and C) and fermentable monosaccharide concentration -glucose+fructose+galactose- (B and D) for OPW hydrolysate when the saccharification is operated at high activities of the enzymes (A and B) and adding only low amounts of the enzyme cocktails (C and D)
- Figure 2.** Evolution of biomass (A), glucose (B), fructose+galactose (C) and D-lactic acid (D) for the experiments carried out with growing cells and 37 g/L CSL: model medium (squares), hydrolysate at 100 % (circles) and hydrolysate diluted at 80 % (triangles).
- Figure 3.** Evolution of biomass (A), glucose (B), fructose+galactose (C) and D-lactic acid (D) for the experiments carried out with resting cells: model medium (squares), hydrolysate at 100 % (circles) and hydrolysate diluted at 80 % (triangles).
- Figure 4.** Model prediction of the experiments with growing cells carried out using (A) model medium, (B) hydrolysate at 100 % and (C) hydrolysate diluted at 80 %.
- Figure 5.** Model prediction of the experiments with resting cells carried out using (A) hydrolysate at 100 % and (B) hydrolysate diluted at 80 %.

Table 1. Composition of selected enzyme mixtures of cellulases, β -glucosidase, polygalacturonase, xylanase, and other auxiliary activities for the fed batch saccharification of OPW solids

	Celluclast 1.5		Novozyme 188		Pectinex Ultra SP-L	
	Activity (FPU/ g dry solid)	Amount (μ L/ g dry solid)	Activity (UI/ g dry solid)	Amount (μ L/ g dry solid)	Activity (UI/ g dry solid)	Amount (μ L/ g dry solid)
High activity	3.18 \pm 0.18	47.5	199 \pm 9	55	162 \pm 2.8	42
Low activity	0.86 \pm 0.11	12	50 \pm 6	13.7	40 \pm 1.8	10.2

Table 2. Final yields to relevant monosaccharides, and their sum, after 96h of fed batch saccharification (5 feedings), at several initial content of water in the solids and using cocktail 1 of enzymes

OPW humidity (%)	Yield to glucose (%)	Yield to fructose (%)	Yield to galactose (%)	Yield to fermentables (%)
80	92.35%	99.94%	71.36%	91.96%
75	94.47%	99.20%	69.90%	92.86%
71.5	88.96%	98.79%	70.64%	88.66%
66.7	83.42%	98.75%	69.55%	86.04%
60	79.15%	99.73%	71.36%	83.95%

Table 3. Final yields to fermentable monosaccharides, and their sum, at 96h of fed batch saccharification (5 feedings), at several initial content of water in the solids and using cocktail 2 of enzymes

OPW humidity (%)	Yield to glucose (%)	Yield to fructose (%)	Yield to galactose (%)	Yield to fermentables (%)
80	72.84%	101.89%	55.64%	78.89%
75	70.27%	100.70%	53.38%	77.06%
71.5	69.42%	101.57%	54.50%	76.60%
66.7	69.15%	99.69%	55.58%	76.48%
60	69.87%	101.70%	54.47%	76.90%

670 **Table 4.** Main experimental parameters (titer, yield and productivity) for different experiments using growing and
671 resting cells

	Experiments with growing cells			Experiments with resting cells		
	Titer (g/L)	Yield (%)	Productivity (g/(L·h))	Titer (g/L)	Yield (%)	Productivity (g/(L·h))
OPW model sugar medium	86.85	81.81	1.62	71.82	66.37	2.39
Pure hydrolysate (100% v/v)	83.16	83.16	1.57	78.03	73.06	2.60
Diluted hydrolysate (80 % v/v)	72.77	81.19	1.82	81.34	89.70	3.70

672

673 **Table 5.** Statistical parameters calculated for different experiments employing growing and resting cells

Statistic Parameter	Growing cells (with CSL)			Resting cell (without CSL)	
	Model Medium	Hydrolysate		Hydrolysate	
		100 %	80 %	100 %	80 %
F _{calc}	2553	6363	4364	3577	2042
F _{tab}	2.29	2.29	2.29	2.34	2.34
RMSE	2.59	1.49	1.67	1.85	2.14
SSR	308.2	85.59	90.96	133.9	166.3
VE (%)	98.91	99.74	99.61	99.03	99.21

674 **Note:** F_{tab} is estimated at 0.95 confidence (p=0.05)

675

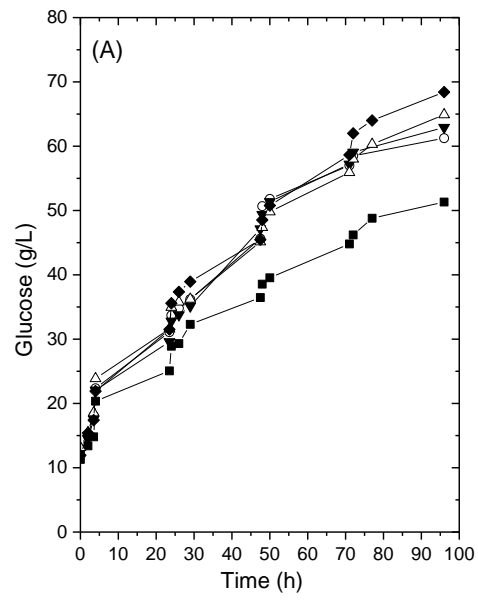
676 **Table 6.** Kinetic model parameters for the experiments using growing and resting cells

Parameter	Growing cells (with CSL)			Resting cells	
	Model Medium	Hydrolysate		Hydrolysate	
		100 %	80 %	100 %	80 %
μ _m (h ⁻¹)	0.68 ± 0.04	0.56 ± 0.05	0.82 ± 0.03	0.12 ± 0.08	0.17 ± 0.05
K _s (g/L)	50.7 ± 5.9	49,9 ± 9.0	50.1 ± 3.6	48.6 ± 7.3	47.5 ± 4.5
K _P · 10 ³ (gP.L)/(gF+G.gX.h)	10.0 ± 2.0	11.0 ± 2.0	12.0 ± 2.0	4.1 ± 0.2	6.0 ± 3.0
v _{P,X} (gP/gX)	11.5 ± 2.1	9.2 ± 1.4	7.9 ± 1.0	11.0 ± 1.2	10.5 ± 0.8
v _{G,X} (gG/gX)	14.4 ± 2.3	12.0 ± 1.4	9.9 ± 1.0	11.6 ± 1.1	12.7 ± 0.4
v _{F+GLP} (gF+G/gP)	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.01	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.2

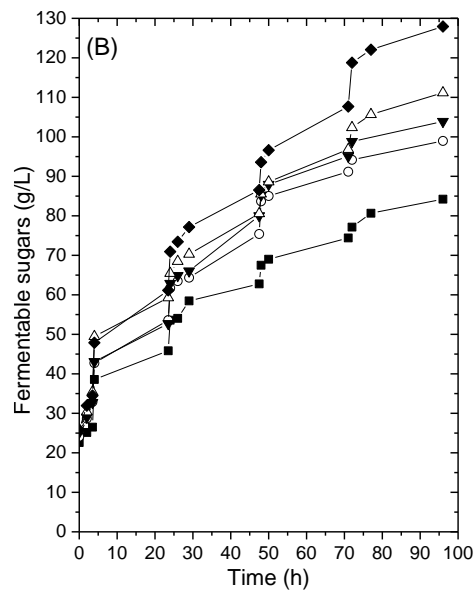
677

678

679



680



681

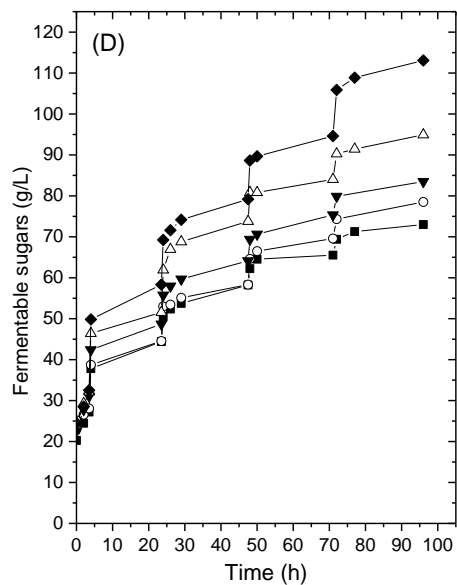
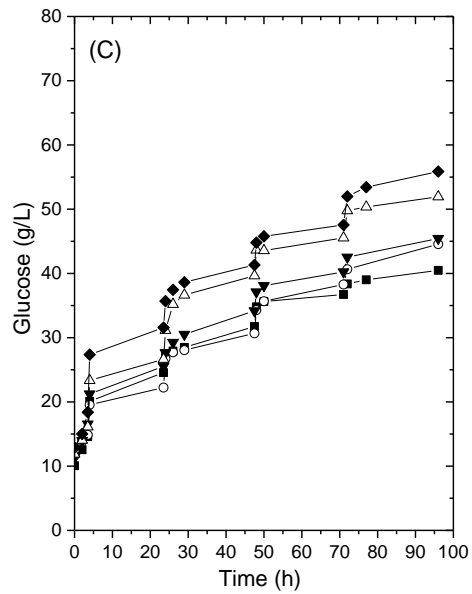
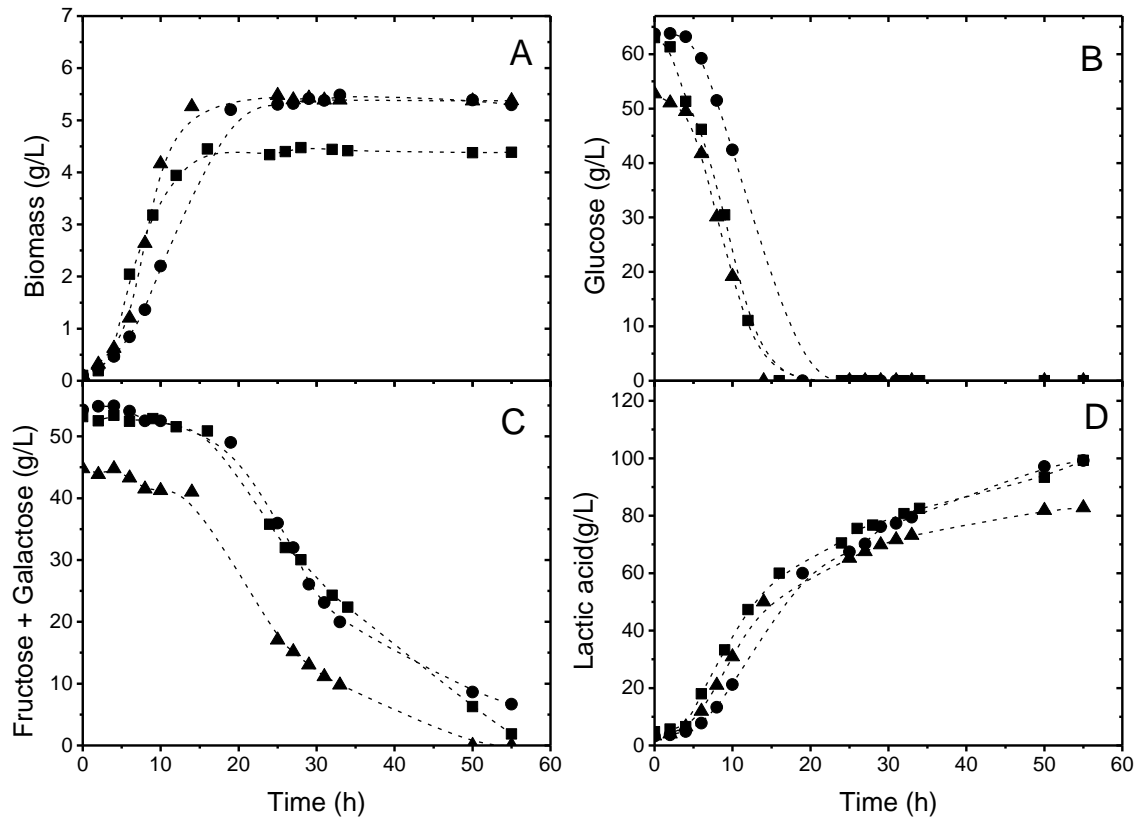


Figure 1. Temporal evolution of glucose (A and C) and fermentable monosaccharide concentration - glucose+fructose+galactose- (B and D) for OPW hydrolysate when the saccharification is operated at high activities of the enzymes (A and B) and adding only low amounts of the enzyme cocktails (C and D)



690

691 **Figure 2.** Evolution of biomass (A), glucose (B), fructose+galactose (C) and D-lactic acid (D) for the
 692 experiments carried out with growing cells and 37 g/L CSL: model medium (squares),
 693 hydrolysate at 100 % (circles) and hydrolysate diluted at 80 % (triangles).

694

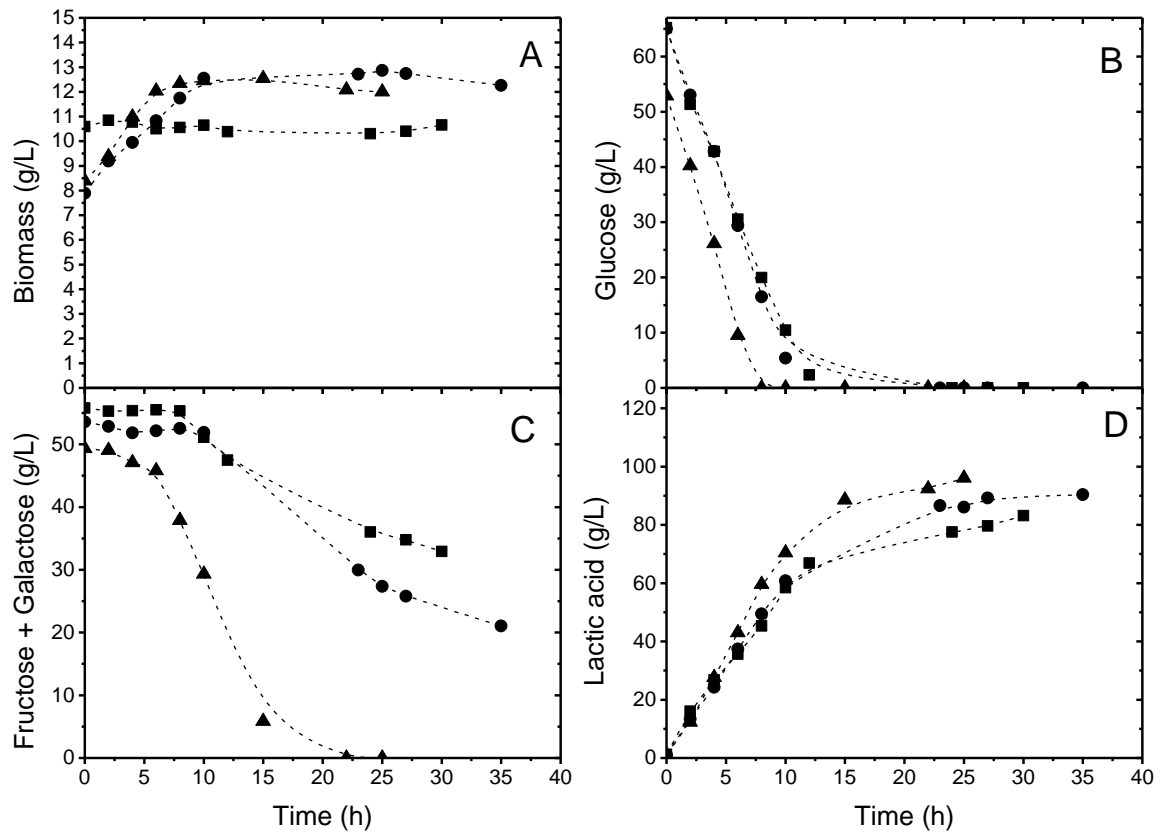
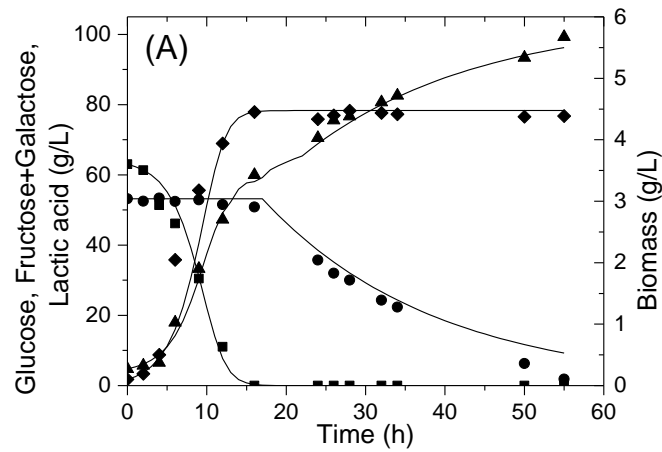
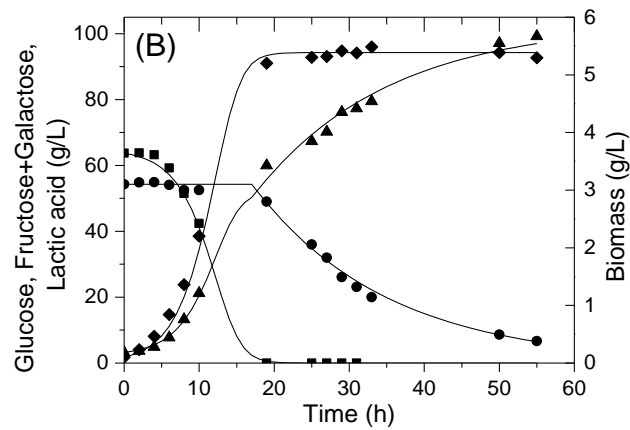


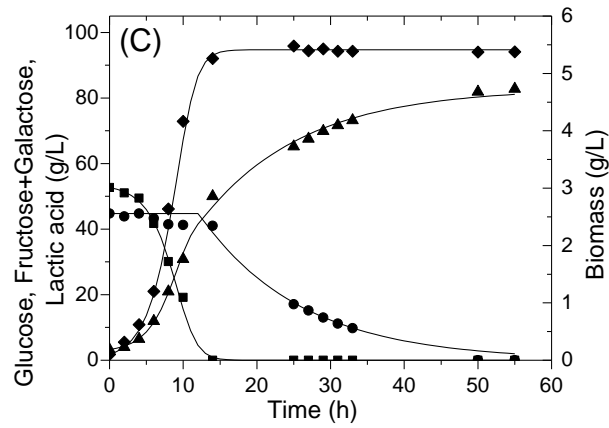
Figure 3. Evolution of biomass (A), glucose (B), fructose+galactose (C) and D-lactic acid (D) for the experiments carried out with resting cells: model medium (squares), hydrolysate at 100 % (circles) and hydrolysate diluted at 80 % (triangles).



700



701



702

703

704 **Figure 4.** Experimental data (points) and kinetic model predictions (lines) for experiments carried out
 705 with model medium (A), hydrolysate at 100 % (B) and hydrolysate diluted at 80 % (C), all
 706 experiments supplemented with corn steep liquor and employing growing cells. Symbols:
 707 glucose (squares), fructose+galactose (circles), D-lactic acid (triangles) and biomass
 708 (diamonds).

709

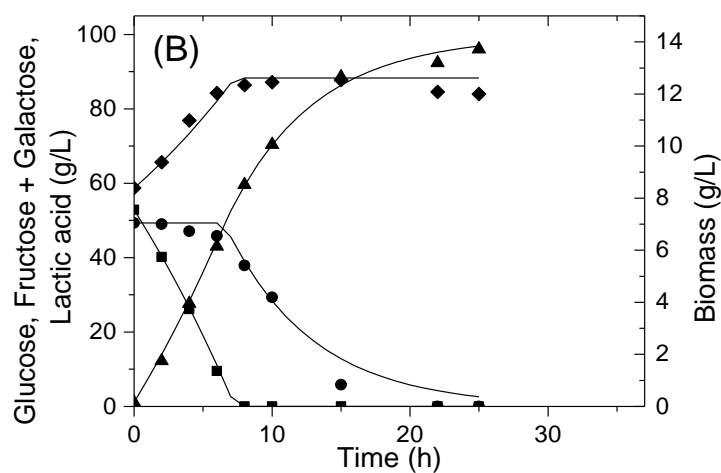
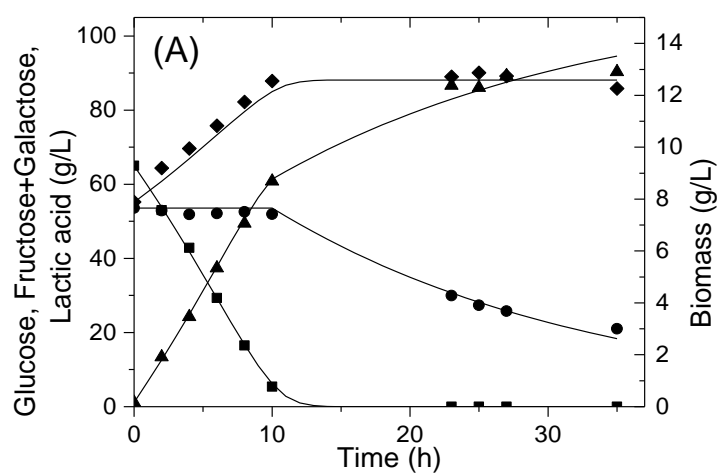


Figure 5. Experimental data (points) and kinetic model predictions (lines) for experiments carried out with hydrolysate at 100 % (A) and hydrolysate diluted at 80 % (B), employing resting cells. Symbols: glucose (squares), fructose+galactose (circles), D-lactic acid (triangles) and biomass (diamonds).

PUBLICACIÓN 4

Autores: Isabel de la Torre, Miguel Ladero y Victoria E. Santos.

Título: Production of D-lactic acid by *L. delbrueckii* growing on orange peel waste hydrolysates and model monosaccharide solutions: effects of pH and temperature on process kinetics

Revista: Biomass Conversion and Biorefinery (2019)

Índice de Impacto (2018): 2,326

Categoría: Ingeniería Química; Energía y Combustibles.

Enlace: <https://doi.org/10.1007/s13399-019-00396-3>

Resumen:

El ácido D-láctico es un monómero calve para la síntesis de biopolímeros como el ácido poliláctico (PLA, *polylactic acid*). En este trabajo se estudia el efecto de la temperatura y del pH en la producción de este monómero, empleando como medio de cultivo una solución modelo de la composición de un hidrolizado de naranja, pero también el hidrolizado de residuos de naranja real. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* CECT 286 produce 0,88 g/g de ácido D-láctico con una pureza del 97 % y una productividad de 2,56 g/(L·h) en las mejores condiciones de operación estudiadas (40 °C y un pH de 5,8). Por otro lado, se propone un modelo cinético (no estructurado y no segregado), capaz de describir la evolución de los diferentes compuestos y se ajusta a los datos experimentales, obteniendo los valores de los parámetros del mismo que reflejan el efecto de la temperatura y del pH en el consumo de azúcares, la producción de ácido D-láctico y el crecimiento del microorganismo. Además, el modelo es capaz de simular de forma excelente los experimentos llevados a cabo con residuo de naranja hidrolizado tanto suplementado con medio MRS y como con *corn steep liquor*.



Production of D-lactic acid by *L. delbrueckii* growing on orange peel waste hydrolysates and model monosaccharide solutions: effects of pH and temperature on process kinetics

Isabel de la Torre¹ · Miguel Ladero¹ · Victoria E. Santos¹

Received: 16 October 2018 / Revised: 16 February 2019 / Accepted: 19 February 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

D-lactic acid is a key monomer of polylactic acid (PLA) and other biopolymers. In this work, the effects of temperature and pH on the D-lactate production with *Lactobacillus delbrueckii* in model sugar solutions and real orange peel waste hydrolysates (OPWH) have been studied and modeled with a non-structured non-segregated kinetic model. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* CECT 286 yields 0.88 g/g of D-lactate (purity 97%) with a productivity of 2.56 g/L·h in the best tested conditions (40 °C and pH 5.8). The proposed kinetic model is able to describe the performed runs, and its kinetic parameters reflect the influence of temperature and pH on the uptake of monosaccharides, D-lactic acid production, and bacterium growth. Moreover, it can be applied to simulate runs with real OPWH supplemented with MRS broth or corn steep liquor (CSL) as a nitrogen source.

Keywords D-lactic acid · Orange peel waste hydrolysates · pH · Temperature · Kinetic model · *Lactobacillus delbrueckii*

1 Introduction

Lactic acid is a hydroxycarboxylic acid that presents two enantiomeric forms: D and L. It has a wide range of applications in food, pharmaceutical, and cosmetic industries [1]. In the last decades, lactic acid is being applied also as monomer for the production of biodegradable and biocompatible plastics, namely poly-lactic acid polymers (PLA) [2–5], with good mechanical, thermal, and gas and water barrier properties. Therefore, their market is increasing at a yearly growth rate of near 19% and a prospective annual production volume of higher than 1.2 million tons by 2020. The physical properties of these polymers are highly dependent on the percentage and distribution of the enantiomers [1, 6]: PLA constituted by a racemic mixture of isomers is less stable than PLA produced from pure D- or L-lactic acid (PDLA and PLLA), while PDLA has also a higher melting temperature than PLLA. This fact explains why research works have been focused on D-lactic acid production [7, 8].

Lactic acid can be synthesized by chemical or fermentation processes. In the first case, the process starts with the hydrolysis of lactonitrile, a compound obtained from oil, yielding a racemic mixture of lactic acid [9]. The biotechnological production, in comparison, has some advantages, as it can provide pure lactic acid isomers at lower costs, avoiding their purification from the racemic mixture. Although the bioproduction of L-lactic acid is realized nowadays at large industrial scale by several companies (NatureWorks LCC, Corbion Purac, Galactia, Henan Jindan Lactic Acid Co. Ltd., and more), the number of studies focused on the bioprocess to obtain the D-enantiomer is relatively scarce [10–12]. At industrial scale, NatureWorks has recently licensed the Optipure® process developed by Plaxica, a process including distillation after an enzymatic resolution of the isomers to obtain pure D-lactic acid, while Corbion Purac has licensed a fermentation technology from Myriant and started to produce D-lactate since 2008 [13]. The main problem of this bioprocess is its low profitability, mostly derived from the raw material cost [3, 4, 14]. Therefore, inexpensive raw materials are needed to increase the economic feasibility of this fermentative process [13, 14].

Most studies on literature focusing on lactic acid production aim to search for novel substrates from renewable resources. Several materials have been considered as optional

✉ Miguel Ladero
mladerog@ucm.es

¹ Chemical and Materials Engineering Department, Chemical Sciences Faculty, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain

4. Abdel-Rahman MA, Tashiro Y, Sonomoto K (2013) Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnol Adv* 31(6):877–902
5. Esteban J, Ladero M (2018) Food waste as a source of value-added chemicals and materials: a biorefinery perspective. *International J. Food Sci Technol* 53(5):1095–1108
6. Van Wouwe P, Dusselier M, Vanleeuw E, Sels B (2016) Lactide synthesis and chirality control for Polylactic acid production. *ChemSusChem* 9(9):907–921
7. Calabia BP, Tokiwa Y (2007) Production of D-lactic acid from sugarcane molasses, sugarcane juice and sugar beet juice by *Lactobacillus delbrueckii*. *Biotechnol Lett* 29(9):1329–1332
8. Liu Y, Gao W, Zhao X, Wang J, Garza E, Manow R, Zhou S (2014) Pilot scale demonstration of d-lactic acid fermentation facilitated by $\text{Ca}(\text{OH})_2$ using a metabolically engineered *Escherichia coli*. *Bioresour Technol* 169:559–565
9. Idris A, Suzana W (2006) Effect of sodium alginate concentration, bead diameter, initial pH and temperature on lactic acid production from pineapple waste using immobilized *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochem* 41(5):1117–1123
10. John RP, Nampoothiri KM, Pandey A (2007) Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 74(3):524–534
11. Hofvendahl K, Hahn-Hägerdal B (2000) Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme Microb Technol* 26(2):87–107
12. Zhang Y, Vadlani P (2013) D-lactic acid biosynthesis from biomass-derived sugars via *Lactobacillus delbrueckii* fermentation. *Bioprocess Biosyst Eng* 36(12):1897–1904
13. Klotz S, Kaufmann N, Kuenz A, Prüße U (2016) Biotechnological production of enantiomerically pure d-lactic acid. *Appl Microbiol Biotechnol* 100(22):9423–9437
14. Abdel-Rahman MA, Tashiro Y, Sonomoto K (2011) Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: overview and limits. *J Biotechnol* 156(4):286–301
15. Joshi D, Singhvi M, Khire J, Gokhale D (2010) Strain improvement of *Lactobacillus lactis* for D-lactic acid production. *Biotechnol Lett* 32(4):517–520
16. Abdel-Rahman MA, Xiao Y, Tashiro Y, Wang Y, Zendo T, Sakai K, Sonomoto K (2015) Fed-batch fermentation for enhanced lactic acid production from glucose/xylose mixture without carbon catabolite repression. *J Biosci Bioeng* 119(2):153–158
17. Yoshida S, Okano K, Tanaka T, Ogino C, Kondo A (2011) Homo-D-lactic acid production from mixed sugars using xylose-assimilating operon-integrated *Lactobacillus plantarum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 92(1):67–76
18. Lu H, Zhao X, Wang Y, Ding X, Wang J, Garza E, Manow R, Iverson A, Zhou S (2016) Enhancement of D-lactic acid production from a mixed glucose and xylose substrate by the *Escherichia coli* strain JH15 devoid of the glucose effect. *BMC Biotechnol* 16(1):19
19. Zhang Y, Vadlani PV, Kumar A, Hardwidge PR, Govind R, Tanaka T, Kondo A (2016) Enhanced D-lactic acid production from renewable resources using engineered *Lactobacillus plantarum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 100(1):279–288
20. Choi IS, Lee YG, Khanal SK, Park BJ, Bae H-J (2015) A low-energy, cost-effective approach to fruit and citrus peel waste processing for bioethanol production. *Appl Energy* 140:65–74
21. de la Torre I, Ravelo M, Segarra S, Tortajada M, Santos VE, Ladero M (2017) Study on the effects of several operational variables on the enzymatic batch saccharification of orange solid waste. *Bioresour Technol* 245(Part A):906–915
22. Prasad S, Srikanth K, Limaye AM, Sivaprakasam S (2014) Homo-fermentative production of d-lactic acid by *Lactobacillus* sp. employing casein whey permeate as a raw feed-stock. *Biotechnol Lett* 36(6):1303–1307
23. Liu S-Q (2003) Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *Int J Food Microbiol* 83(2):115–131
24. Almquist J, Cvijovic M, Hatzimanikatis V, Nielsen J, Jirstrand M (2014) Kinetic models in industrial biotechnology—improving cell factory performance. *Metab Eng* 24:38–60
25. Goncalves L, Xavier A, Almeida J, Carrondo M (1991) Concomitant substrate and product inhibition kinetics in lactic acid production. *Enzym Microb Technol* 13(4):314–319
26. Åkerberg C, Hofvendahl K, Zacchi G, Hahn-Hägerdal B (1998) Modelling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid concentrations on the kinetics of lactic acid production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 in whole-wheat flour. *Appl Microbiol Biotechnol* 49(6):682–690
27. Kwan TH, Vlysidis A, Wu Z, Hu Y, Koutinas A, Lin CSK (2017) Lactic acid fermentation modelling of *Streptococcus thermophilus* YI-B1 and *Lactobacillus casei* Shirota using food waste derived media. *Biochem Eng J* 127:97–109
28. Schepers AW, Thibault J, Lacroix C (2002) *Lactobacillus helveticus* growth and lactic acid production during pH-controlled batch cultures in whey permeate/yeast extract medium. Part I multiple factor kinetic analysis. *Enzym Microb Technol* 30(2):176–186
29. Schmitt E, Bura R, Gustafson R, Ehsanipour M (2016) Kinetic modeling of *Moorella thermoacetica* growth on single and dual-substrate systems. *Bioprocess Biosyst Eng* 39(10):1567–1575
30. Lameiras F, Ras C, ten Pierick A, Heijnen JJ, van Gulik WM (2018) Stoichiometry and kinetics of single and mixed substrate uptake in *Aspergillus niger*. *Bioprocess Biosyst Eng* 41(2):157–170
31. Glaser R, Venus J (2017) Model-based characterisation of growth performance and L-lactic acid production with high optical purity by thermophilic *Bacillus coagulans* in a lignin-supplemented mixed substrate medium. *New Biotechnol* 37:180–193
32. Choi M, Al-Zahrani SM, Lee SY (2014) Kinetic model-based feed-forward controlled fed-batch fermentation of *Lactobacillus rhamnosus* for the production of lactic acid from Arabic date juice. *Bioprocess Biosyst Eng* 37(6):1007–1015
33. John E, Dennis J, Gay DM, Welsch RE (1981) Algorithm 573: NL2SOL—an adaptive nonlinear least-squares algorithm [E4]. *ACM Trans Math Softw* 7(3):369–383
34. Rodriguez A, Wojtusik M, Masca F, Santos VE, Garcia-Ochoa F (2017) Kinetic modeling of 1, 3-propanediol production from raw glycerol by *Shimwellia blattae*: influence of the initial substrate concentration. *Biochem Eng J* 117:57–65
35. Grobgen G, Smith M, Sikkema J, De Bont J (1996) Influence of fructose and glucose on the production of exopolysaccharides and the activities of enzymes involved in the sugar metabolism and the synthesis of sugar nucleotides in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772. *Appl Microbiol Biotechnol* 46(3):279–284
36. Bachmann H, Teusink B, Kok J, Kuipers OP (2018) Further elucidation of galactose utilization in *Lactococcus lactis* MG1363. *Front Microbiol* 9:1803
37. Kang TS, Korber DR, Tanaka T (2013) Regulation of dual glycolytic pathways for fructose metabolism in heterofermentative *Lactobacillus panis* PM1. *Appl Environ Microbiol* 79(24):7818–7826
38. Kashket ER (1987) Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiol Rev* 3(3):233–244

PUBLICACIÓN 5

Autores: Isabel de la Torre, Miguel Ladero y Victoria E. Santos.

Título: Production of D-lactic acid by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* from orange peel waste: techno-economical assessment of nitrogen sources.

Revista: Applied Microbiology and Biotechnology 102 (2018) 10511-10521.

Índice de Impacto (2017): 3,670

Categoría: Biotecnología y Microbiología Aplicada

Enlace: <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9432-4>

Resumen:

Las bacterias lácticas, empleadas principalmente en la industria para llevar a cabo la producción de ácido láctico, tienen altos requerimientos nutricionales para crecer, por lo que la fuente de nitrógeno es un factor clave para llevar a cabo la producción de este ácido, ya que repercute tanto en los rendimientos finales, como en los costes de operación del proceso, llegando a suponer el 38 % de estos. En este trabajo se estudia el efecto de distintas fuentes de nitrógeno (peptona, extracto de carne, extracto de levadura y *corn steep liquor*) en la producción de ácido D-láctico, empleando *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* como biocatalizador. Basándose en los rendimientos, productividad, y costes por tonelada de ácido láctico, se determina que el *corn steep liquor* es la mejor fuente de nitrógeno para este proceso. Por último, comprueba su efecto, empleando hidrolizado de residuos de naranja suplementado con 37 g/L de *corn steep liquor* para llevar a cabo la producción de ácido D-láctico; obteniendo un rendimiento del 88 % y una productividad de 2,35 g/(L·h), estimando un coste en la fuente de nitrógeno de 90,78 \$/ton de ácido láctico.



Production of D-lactic acid by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* from orange peel waste: techno-economical assessment of nitrogen sources

I. de la Torre¹ · M. Ladero¹ · V. E. Santos¹

Received: 20 June 2018 / Revised: 19 September 2018 / Accepted: 25 September 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

In this study, the effect of several organic nitrogen sources (namely peptone, meat extract—ME, yeast extract—YE, and corn steep liquor—CSL) on D-lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* has been studied. While lactic acid bacteria (LAB) are well-known for their complex nutritional requirements, organic nitrogen source-related cost can be as high as 38% of total operational costs (OPEX), being its nature and concentration critical factors in the growth and productivity of the selected strain. Corn steep liquor (CSL) has been chosen for its adequacy, on the grounds of the D-lactic acid yield, productivity, and its cost per kilogram of product. Finally, orange peel waste hydrolysate supplemented with 37 g/l CSL has been employed for D-lactic acid production, reaching a final yield of 88% and a productivity of 2.35 g/l h. CSL cost has been estimated at 90.78\$/ton of D-lactate.

Keywords Nitrogen source · Corn steep liquor · D-lactic acid · Techno-economical assessment · Orange peel waste

Introduction

Lactic acid bacteria (LAB) are a large group of microorganisms capable of producing lactic acid in high amounts. Homofermentative LABs employ the Embden-Meyerhof pathway, producing only lactic acid. Heterofermentative LABs follow the phosphogluconate and phosphoketolase pathway, where lactic acid is one of the products, with a mass yield of 0.5 g/g of hexose consumed. A given strain can produce D- or L-lactic acids or a mixture of both isomers (Abdel-Rahman et al. 2013; Eiteman and Ramalingam 2015; Klotz et al. 2016; Mazzoli et al. 2014). *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* has been reported as a homofermentative producer of D-lactic acid (Zhang and Vadlani 2013). This bacterium yields 90%, 95%, and 88% D-lactic acid from sugarcane molasses, sugarcane juice, and sugar beet juice, respectively (Calabia and Tokiwa 2007).

Lactic acid (LA) is an important chemical for the food, pharmaceutical, cosmetic, and textile industries. In particular, L- and D-lactic acids are prominent monomers of the bioplastic industry, which are utilized to produce an environmentally friendly alternative to petrochemical polymers: polylactic acid (PLA) (Esteban and Ladero 2018). The presence of different amounts of L- and D-lactic acid monomers or oligomers in the polymer determines a wide variety of morphological, mechanical, and thermal properties (Abdel-Rahman et al. 2011; John et al. 2009; Klotz et al. 2016; Singhvi et al. 2018; Wang et al. 2015). Only microorganisms are able to produce pure isomers (D or L) (John et al. 2007), being the operation conditions like pH controlling base, pH value, temperature, and cell recycling in continuous processes very effective to achieve high selectivity to the isomer of interest (Tashiro et al. 2011). Although the L-isomer has been studied in detail, works devoted to D-lactic acid are rather scarce (Wang et al. 2015; Zhang and Vadlani 2013).

Production costs of PLA are high, mainly due to expensive fermentation media components. To overcome this problem, several residues have been employed as raw material (Abdel-Rahman et al. 2011; Abdel-Rahman et al. 2013; John et al. 2007; Wang et al. 2015; Zhang et al. 2016). When using date juice, an 82% yield of lactic acid was achieved in batch operations, increasing LA titers with further fed-batch strategies (Choi et al. 2014). Liquid pineapple wastes were also

✉ M. Ladero
mladerog@ucm.es

¹ Materials and Chemical Engineering Department, Chemical Sciences School, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain

- Klotz S, Kaufmann N, Kuenz A, Prüße U (2016) Biotechnological production of enantiomerically pure d-lactic acid. *Appl Microbiol Biotechnol* 100(22):9423–9437
- Klotz S, Kuenz A, Prüße U (2017) Nutritional requirements and the impact of yeast extract on the d-lactic acid production by *Sporolactobacillus inulinus*. *Green Chem* 19(19):4633–4641
- Kwan TH, Hu Y, Lin CSK (2016) Valorisation of food waste via fungal hydrolysis and lactic acid fermentation with *Lactobacillus casei* Shirota. *Bioresour Technol* 217:129–136
- Kwon S, Lee PC, Lee EG, Chang YK, Chang N (2000) Production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* with vitamin-supplemented soybean hydrolysate. *Enzym Microb Technol* 26(2–4):209–215
- Lu Z, Lu M, He F, Yu L (2009) An economical approach for D-lactic acid production utilizing unpolished rice from aging paddy as major nutrient source. *Bioresour Technol* 100(6):2026–2031
- Man JCD, Rogosa M, Sharpe EM (1960) A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J Appl Bacteriol* 23(1):130–135
- Mazzoli R, Bosco F, Mizrahi I, Bayer EA, Pessione E (2014) Towards lactic acid bacteria-based biorefineries. *Biotechnol Adv* 32(7):1216–1236
- Nancib A, Nancib N, Meziane-Cherif D, Boubendir A, Fick M, Boudrant J (2005) Joint effect of nitrogen sources and B vitamin supplementation of date juice on lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. *Bioresour Technol* 96(1):63–67
- Negro V, Mancini G, Ruggeri B, Fino D (2016) Citrus waste as feedstock for bio-based products recovery: review on limonene case study and energy valorization. *Bioresour Technol* 214:806–815. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.006>
- Nguyen CM, Choi GJ, Choi YH, Jang KS, Kim J-C (2013) D- and L-lactic acid production from fresh sweet potato through simultaneous saccharification and fermentation. *Biochem Eng J* 81:40–46
- Okano K, Hama S, Kihara M, Noda H, Tanaka T, Kondo A (2017) Production of optically pure d-lactic acid from brown rice using metabolically engineered *Lactobacillus plantarum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 101(5):1869–1875
- Papadimitriou K, Alegria A, Bron PA, De Angelis M, Gobbetti M, Kleerebezem M, Lemos JA, Linares DM, Ross P, Stanton C (2016) Stress physiology of lactic acid bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 80(3):837–890
- Prasad S, Srikanth K, Limaye AM, Sivaprakasam S (2014) Homo-fermentative production of d-lactic acid by *Lactobacillus* sp. employing casein whey permeate as a raw feed-stock. *Biotechnol Lett* 36(6):1303–1307
- Renitha TS, Sridevi J, Gowthaman M, Kamini N, Ramanaiah B, Saravanan P (2015) Wealth from waste—beef extract for microbiological media from tannery solid waste. *RSC Adv* 5(13):9891–9897
- Rezzadori K, Benedetti S, Amante ER (2012) Proposals for the residues recovery: Orange waste as raw material for new products. *Food Bioprod Process* 90(4):606–614
- Ritala A, Häkkinen ST, Toivari M, Wiebe MG (2017) Single cell protein—state-of-the-art, industrial landscape and patents 2001–2016. *Front Microbiol* 8:2009
- Singhvi M, Jadhav A, Gokhale D (2013) Supplementation of medium with diammonium hydrogen phosphate enhanced the D-lactate dehydrogenase levels leading to increased D-lactic acid productivity. *Bioresour Technol* 146:736–739
- Singhvi M, Zendo T, Sonomoto K (2018) Free lactic acid production under acidic conditions by lactic acid bacteria strains: challenges and future prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 102(14):1–14
- Tan J, Jahim J, Wu T, Harun S, Mumtaz T (2016) Use of corn steep liquor as an economical nitrogen source for biosuccinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*. In: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, vol 36. IOP Publishing, p 012058
- Tashiro Y, Kaneko W, Sun Y, Shibata K, Inokuma K, Zendo T, Sonomoto K (2011) Continuous d-lactic acid production by a novel thermotolerant *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* QU 41. *Appl Microbiol Biotechnol* 89(6):1741–1750
- Tejayadi S, Cheryan M (1995) Lactic acid from cheese whey permeate. Productivity and economics of a continuous membrane bioreactor. *Appl Microbiol Biotechnol* 43(2):242–248
- Van Dyk JS, Gama R, Morrison D, Swart S, Pletschke BI (2013) Food processing waste: problems, current management and prospects for utilisation of the lignocellulose component through enzyme synergistic degradation. *Renew Sust Energ Rev* 26:521–531
- Wang L, Zhao B, Li F, Xu K, Ma C, Tao F, Li Q, Xu P (2011) Highly efficient production of D-lactate by *Sporolactobacillus* sp. CASD with simultaneous enzymatic hydrolysis of peanut meal. *Appl Microbiol Biotechnol* 89(4):1009–1017
- Wang Y, Tashiro Y, Sonomoto K (2015) Fermentative production of lactic acid from renewable materials: recent achievements, prospects, and limits. *J Biosci Bioeng* 119(1):10–18
- Yoo I-K, Chang HN, Lee EG, Chang YK, Moon S-H (1997) Effect of B vitamin supplementation on lactic acid production by *Lactobacillus casei*. *J Ferment Bioeng* 84(2):172–175
- Zhang Y, Vadlani PV (2013) D-Lactic acid biosynthesis from biomass-derived sugars via *Lactobacillus delbrueckii* fermentation. *Bioprocess Biosyst Eng* 36(12):1897–1904
- Zhang Y, Vadlani PV, Kumar A, Hardwidge PR, Govind R, Tanaka T, Kondo A (2016) Enhanced D-lactic acid production from renewable resources using engineered *Lactobacillus plantarum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 100(1):279–288

PUBLICACIÓN 6

Autores: Isabel de la Torre, Miguel G. Acedos, Miguel Ladero y Victoria E. Santos.

Título: On the use of resting *L. delbrueckii* spp. *delbrueckii* cells for D-lactic acid production from orange peel wastes hydrolysates

Revista: Biochemical Engineering Journal 145 (2019) 162-169

Índice de Impacto (2018): 3,371

Categoría: Biotecnología y Microbiología Aplicada

Enlace: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.02.012>

Resumen:

La producción de isómeros puros de ácido láctico tiene, actualmente, un gran interés, ya que la modificación en los porcentajes de ambos provoca cambios de las propiedades del ácido poliláctico obtenido, lo que permite su uso para una mayor gama de aplicaciones. Los principales problemas que presenta el proceso de fermentación de ácido láctico son los costes tanto del medio de cultivo (fuente de carbono y de nitrógeno principalmente) y como del aislamiento y purificación del caldo de cultivo. Para conseguir reducir esos costes, en este trabajo se propone, por una parte, el empleo de hidrolizado de residuos de naranja como fuente de carbono; y, por otra, llevar a cabo la fermentación con células en estado de *resting* (sin introducir una fuente de nitrógeno). Para ello se desarrolla una estrategia que permite mejorar el consumo de los azúcares presentes en el residuo (glucosa, fructosa y galactosa), y se optimiza la agitación y concentración de biomasa empleadas en el proceso. Los resultados obtenidos muestran una mejora muy significativa en la productividad del proceso, de 6,72 g/(L·h), obteniendo 50 g/L de ácido D-láctico.



Regular article

On the use of resting *L. delbrueckii* spp. *delbrueckii* cells for D-lactic acid production from orange peel wastes hydrolysates

I. de la Torre, M.G. Acedos, M. Ladero, V.E. Santos*

Chemical and Materials Engineering Department. Chemical Sciences School, Complutense University of Madrid, 28040, Madrid, Spain



HIGHLIGHTS

- A new strategy is proposed for cells production in order to optimize the sugars uptake.
- The adaptation of the cells to the mixture of sugars from the orange peel waste is mandatory.
- The use of resting cells improves the results for D-lactic acid production.
- 6.72 g/L.h (productivity) and 87.8% (yield) are achieved from orange peel wastes hydrolysates.

ARTICLE INFO

Keywords:

Resting cells

D-lactic acid

Orange peel waste hydrolysates

Lactobacillus delbrueckii

ABSTRACT

The availability of pure isomers of lactic acid is a key aspect of the fabrication of polymers based on poly-lactic acid with enhanced mechanical and thermal properties. The main problems presented in the fermentation process to D-Lactic acid production are the costs derived from the carbon and nitrogen sources and the purification ones. In this work, the production is carried out using hydrolyzed orange peel wastes (OPW) as a cheap carbon source and a resting cells production process is developed to avoid the nitrogen source costs and to reduce them in the purification processes. A strategy to adapt the strain for the uptake of the mixture of sugars presented in the orange peel hydrolysate is developed in order to improve the fructose and galactose uptake rates. A D-lactic acid productivity important increase (6.72 g/L.h) is obtained from OPW hydrolysates using resting *L. delbrueckii* cells when grown on fructose during the growth stage.

1. Introduction

Lactic acid is an important chemical product due to its wide applications in a high number of industries. Traditionally, its main application has been in food industries as acidulant, flavor enhancer and preservative, but also lactic acid is employed in cosmetic, textile and pharmaceutical industries. In the last years this chemical has gained interest in order to synthesize poly-lactic acid (PLA), a biodegradable and environmental friendly polymer, which can replace synthetic plastics derived from petroleum [1–3]. PLAs can be constituted by only D- or L- lactic acid isoform or by both isomers, and the physical properties of the polymer, such as crystallinity or thermal stability, depend on the proportion of each isomer in the final product. Therefore, in order to be able to produce PLAs with different properties it is necessary to obtain both isomers by separated processes [4–6]. The fermentative production is the best way to obtain D- or L- pure lactic acid, in comparison with lactic acid produced by chemical synthesis, where is

obtained a racemic mixture using energy intensive processes [7,8]. The fermentative production of L- lactic acid isomer has been highly studied, but the works related to D-lactic acid production are increasing nowadays [4]. This fermentation is performed mainly by means of a group of bacteria known as lactic acid bacteria (LAB); in addition, other species belonging to genus *Bacillus* have been also used. Moreover, genetic engineering techniques have been applied to *E. coli*, *C. glutamicum* or yeast of genus *Candida*, *Saccharomyces* or *Pichia*, among others, to produce D-lactic acid [9].

Currently, the PLA demand is growing, although the high manufacturing costs of the D- isomer should be reduced by selecting inexpensive culture media components (carbon substrates, nitrogen sources and nutritional requirements for cell growth) and simplifying purification operations [9,10].

Several works in literature focus on searching affordable raw materials as substrates in the process (see Table 1): Food and bakery wastes have been employed for lactic acid production [3,11] also,

* Corresponding author.

E-mail address: vesantos@ucm.es (V.E. Santos).<https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.02.012>

Received 21 December 2018; Received in revised form 6 February 2019; Accepted 9 February 2019

Available online 11 February 2019

1369-703X/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

get them used to uptake both fructose and galactose. There is no need to use a nitrogen source for the production stage due to the OPW having nitrogen compounds itself. The use of resting cells for D-lactic acid production would provide cost savings both in nitrogen sources and in purification processes.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the funding provided by MINECO through contracts CTQ2013-45970-C2-1-R, PCIN-2013-021-C02-01 and BSCH-UCM, GR35/10-A 910134.

References

- [1] Y. Wang, Y. Tashiro, K. Sonomoto, Fermentative production of lactic acid from renewable materials: recent achievements, prospects, and limits, *J. Biosci. Bioeng.* 119 (2015) 10–18.
- [2] F.A.C. Martinez, E.M. Balciunas, J.M. Salgado, J.M.D. González, A. Converti, R.P. de Souza, Oliveira, Lactic acid properties, applications and production: a review, *Trends Food Sci. Technol.* 30 (2013) 70–83.
- [3] J. Esteban, M. Ladero, Food waste as a source of value-added chemicals and materials: a biorefinery perspective, *Int. J. Food Sci. Technol.* 53 (2018) 1095–1108.
- [4] S. Klotz, N. Kaufmann, A. Kuenz, U. Prüße, Biotechnological production of enantiomerically pure D-lactic acid, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100 (2016) 9423–9437.
- [5] E. Castro-Aguirre, F. Iñiguez-Franco, H. Samsudin, X. Fang, R. Auras, Poly (lactic acid)—mass production, processing, industrial applications, and end of life, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 107 (2016) 333–366.
- [6] M.A. Eiteman, S. Ramalingam, Microbial production of lactic acid, *Biotechnol. Lett.* 37 (2015) 955–972.
- [7] M.A. Abdel-Rahman, Y. Tashiro, K. Sonomoto, Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: overview and limits, *J. Biotechnol.* 156 (2011) 286–301.
- [8] P. Van Wouwe, M. Dusselier, E. Vanleeuw, B. Sels, Lactide synthesis and chirality control for polylactic acid production, *ChemSusChem* 9 (2016) 907–921.
- [9] M.A. Abdel-Rahman, Y. Tashiro, K. Sonomoto, Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes, *Biotechnol. Adv.* 31 (2013) 877–902.
- [10] K. Okano, T. Tanaka, C. Ogino, H. Fukuda, A. Kondo, Biotechnological production of enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: recent achievements, perspectives, and limits, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85 (2010) 413–423.
- [11] T.H. Kwan, Y. Hu, C.S.K. Lin, Valorisation of food waste via fungal hydrolysis and lactic acid fermentation with *Lactobacillus casei* Shirota, *Bioresour. Technol.* 217 (2016) 129–136.
- [12] Z. Bai, Z. Gao, J. Sun, B. Wu, B. He, D-Lactic acid production by *Sporolactobacillus inulinus* YBS1-5 with simultaneous utilization of cottonseed meal and corn cob residue, *Bioresour. Technol.* 207 (2016) 346–352.
- [13] S. Hama, S. Mizuno, M. Kihara, T. Tanaka, C. Ogino, H. Noda, A. Kondo, Production of D-lactic acid from hardwood pulp by mechanical milling followed by simultaneous saccharification and fermentation using metabolically engineered *Lactobacillus plantarum*, *Bioresour. Technol.* 187 (2015) 167–172.
- [14] I. de la Torre, M. Ravelo, S. Segarra, M. Tortajada, V.E. Santos, M. Ladero, Study on the effects of several operational variables on the enzymatic batch saccharification of orange solid waste, *Bioresour. Technol.* 245 (2017) 906–915.
- [15] M.A. Abdel-Rahman, K. Sonomoto, Opportunities to overcome the current limitations and challenges for efficient microbial production of optically pure lactic acid, *J. Biotechnol.* 236 (2016) 176–192.
- [16] Y. Zhang, P.V. Vadlani, Lactic acid production from biomass-derived sugars via co-fermentation of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus plantarum*, *J. Biosci. Bioeng.* 119 (2015) 694–699.
- [17] F. Cui, Y. Li, C. Wan, Lactic acid production from corn stover using mixed cultures of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus brevis*, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 1831–1836.
- [18] H. Lu, X. Zhao, Y. Wang, X. Ding, J. Wang, E. Garza, R. Manow, A. Iverson, S. Zhou, Enhancement of D-lactic acid production from a mixed glucose and xylose substrate by the *Escherichia coli* strain JH15 devoid of the glucose effect, *BMC Biotechnol.* 16 (2016) 19.
- [19] A. Nancib, N. Nancib, D. Meziane-Cherif, A. Boubendir, M. Fick, J. Boudrant, Joint effect of nitrogen sources and B vitamin supplementation of date juice on lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*, *Bioresour. Technol.* 96 (2005) 63–67.
- [20] N. Assavasirijinda, D. Ge, B. Yu, Y. Xue, Y. Ma, Efficient fermentative production of polymer-grade D-lactate by an engineered alkaliphilic *Bacillus* sp. strain under non-sterile conditions, *Microbiol. Cell Factor.* 15 (2016) 3.
- [21] S. Prasad, K. Srikanth, A.M. Limaye, S. Sivaprakasam, Homo-fermentative production of D-lactic acid by *Lactobacillus* sp. employing casein whey permeate as a raw feed-stock, *Biotechnol. Lett.* 36 (2014) 1303–1307.
- [22] Y. Li, L. Wang, J. Ju, B. Yu, Y. Ma, Efficient production of polymer-grade D-lactate by *Sporolactobacillus laevolacticus* DSM442 with agricultural waste cottonseed as the sole nitrogen source, *Bioresour. Technol.* 142 (2013) 186–191.
- [23] Y. Tsuge, H. Kawaguchi, K. Sasaki, T. Tanaka, A. Kondo, Two-step production of D-lactate from mixed sugars by growing and resting cells of metabolically engineered *Lactobacillus plantarum*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98 (2014) 4911–4918.
- [24] Y. Doleys, P. Beck, S. Vollenweider, C. Lacroix, Production of 3-hydroxypropionaldehyde using a two-step process with *Lactobacillus reuteri*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68 (2005) 467–474.
- [25] M. Helanto, K. Kiviharju, M. Leisola, A. Nyyssölä, Metabolic engineering of *Lactobacillus plantarum* for production of L-rubulose, *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (2007) 7083–7091.
- [26] Y. Zhang, L. Song, Q. Gao, S.M. Yu, L. Li, N.F. Gao, The two-step biotransformation of monosodium glutamate to GABA by *Lactobacillus brevis* growing and resting cells, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94 (2012) 1619–1627.
- [27] X. Shi, C. Chang, S. Ma, Y. Cheng, J. Zhang, Q. Gao, Efficient bioconversion of L-glutamate to γ -aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* resting cells, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 44 (2017) 697–704.
- [28] K. Papadimitriou, Á. Alegría, P.A. Bron, M. De Angelis, M. Gobetti, M. Kleerebezem, J.A. Lemos, D.M. Linares, P. Ross, C. Stanton, Stress physiology of lactic acid bacteria, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80 (2016) 837–890.
- [29] S. Tejyadi, M. Cheryan, Lactic acid from cheese whey permeate. Productivity and economics of a continuous membrane bioreactor, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43 (1995) 242–248.
- [30] S. Benthin, J. Nielsen, J. Villadsen, Two uptake systems for fructose in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FD1 produce glycolytic and gluconeogenic fructose phosphates and induce oscillations in growth and lactic acid formation, *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (1993) 3206–3211.
- [31] Z. Lu, H. Fleming, R. McFeeters, Differential glucose and fructose utilization during cucumber juice fermentation, *J. Food Sci.* 66 (2001) 162–166.
- [32] J. Thompson, Regulation of sugar transport and metabolism in lactic acid bacteria, *FEMS Microbiol. Rev.* (1987) 221–231.
- [33] M.G. Gaenzle, Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage, *Curr. Opin. Food Sci.* 2 (2015) 106–117.
- [34] P. Postma, J. Lengeler, Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system of bacteria, *Microbiol. Rev.* 49 (1985) 232.
- [35] A. Galinier, J. Deutscher, Sophisticated regulation of transcriptional factors by the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system, *J. Mol. Biol.* 429 (2017) 773–789.
- [36] J. Deutscher, C. Francke, P.W. Postma, How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70 (2006) 939–1031.
- [37] A. de Oliveira Moraes, N.I.B. Ramirez, N. Pereira, Evaluation of the fermentation potential of pulp mill residue to produce D (–)-lactic acid by separate hydrolysis and fermentation using *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 180 (2016) 1574–1585.
- [38] S. Marques, F. Gírio, J. Santos, J. Roseiro, Pulsed fed-batch strategy towards intensified process for lactic acid production using recycled paper sludge, *Biomass Convers. Bioref.* 7 (2017) 127–137.